

Modulation unterschiedlicher Formen der Multidrug-Resistenz mittels eines Multitargetmultiribozymes

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Petra Kowalski

geboren am 29.12.1974 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
 2. PD Dr. Hermann Lage
 3. PD Dr. Carsten Denkert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.06

ZUSAMMENFASSUNG

Die Chemotherapie mit Zytostatika ist eine wichtige Therapieform bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Allerdings entwickeln Tumorzellen häufig Resistenzen, meist gegen verschiedene strukturell und funktionell unabhängige Zytostatika; ein Phänomen, das als Multidrug-Resistenz (MDR) bezeichnet wird und die Hauptursache für das Scheitern einer Chemotherapie ist. Mit Hilfe von *in vitro*-Untersuchungen wurden erhöhte Genexpressionen der ABC-Transporter MDR1, MRP2 und BCRP in verschiedenen MDR-Tumorzelllinien als maßgebliche Resistenzfaktoren identifiziert, wie z.B. in den Magenkarzinomzelllinien EPG85-257RDB (MDR1) und EPG85-257RNOV (BCRP) sowie in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS (MRP2).

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines auf Ribozym-Technologie basierenden Therapieansatzes, welcher die Expressionen der oben genannten ABC-Transporter simultan inhibiert und dessen Anwendung zur Reversion der zellulären MDR führt.

Dazu wurde ein Multitargetmultiribozym (MTMR) entwickelt, das aus *in trans*-aktiven Ribozymen besteht, die gegen die ABC-Transporter mRNAs gerichtet sind sowie aus *in cis*-spaltenden Ribozymen und aus *Spacer*-RNA-Sequenzen. Es gelang der Nachweis der autokatalytischen Spaltung des MTMRs, welche zur Freisetzung von *in trans*-aktiven Ribozymen führte. Die Analyse der kinetischen Parameter des MTMRs ergab, daß die autokatalytisch entstandenen MTMR-Fragmente ihre Substrat-RNAs im Vergleich zu den korrespondierenden Monoribozymen ohne Einbuße an Effizienz spalten können. Darüber hinaus wurde die MTMR-Sequenz stabil in den drei eingangs genannten MDR-Zelllinien exprimiert, was in einer signifikanten Reduktion der jeweiligen Ziel-mRNAs (Reduktion der MDR1-mRNA um 97 %, der BCRP-mRNA um 80 %, der MRP2-mRNA um 96 %) und der entsprechenden Proteine resultierte. Die Multidrug-Resistenz konnte aufgrund der MTMR-Expression um 70% (A2780RCIS), 95% (257RNOV) und 100% (257RDB) aufgehoben werden. Analog dazu zeigte sich in den 257RNOV-Zellen eine komplette und in den 257RDB-Zellen eine 90%ige Reversion der jeweiligen Zytostatikumsakkumulation.

Das MTMR stellt erstmalig ein RNA-Konstrukt dar, welches in der Lage ist, simultan mehrere unabhängige Gene funktionell auszuschalten. Es besitzt daher ein großes Potential sowohl für grundlagenorientierte Forschung als auch zukünftige gentherapeutische Ansätze.

*Freudig war, vor vielen Jahren,
Eifrig so der Geist bestrebt,
Zu erforschen, zu erfahren,
Wie Natur im Schaffen lebt.
Und es ist das ewig Eine,
Das sich vielfach offenbart:
Klein das Große, groß das Kleine,
Alles nach der eignen Art,
Immer wechselnd, fest sich haltend,
Nah und fern und fern und nah,
so gestaltend, umgestaltend -
Zum Erstaunen bin ich da.*

J. W. Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumoren	2
1.1.1	Daunorubicin und Mitoxantron	3
1.1.2	Cisplatin.....	4
1.2	Chemoresistenzen von Tumorzellen	5
1.2.1	Bedeutung von ABC-Transportern.....	8
1.2.2	Die ABC-Transporter MDR1/P-Gp, BCRP und MRP2.....	10
1.2.2.1	MDR1/P-Gp/ABCB1	10
1.2.2.2	BCRP/ABCG2.....	11
1.2.2.3	MRP2/ABCC2.....	12
1.2.3	Tumorzelllinien als Untersuchungsmodelle für Resistenzmechanismen.....	13
1.3	RNA-Technologien zur Genregulation	15
1.3.1	<i>Antisense</i> -Oligodesnukleotide (AS-ODN)	16
1.3.2	RNA-Interferenz.....	17
1.3.3	Ribozyme.....	17
1.3.3.1	<i>Hammerhead</i> -Ribozyme.....	18
1.3.3.1.1	<i>Hammerhead</i> -Ribozym-Spaltung <i>in cis</i> und <i>in trans</i>	21
1.3.3.2	Kinetische Charakterisierung von Ribozymen	22
1.4	Zielstellung der Arbeit.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.3	Chemikalien.....	27
2.1.4	Radionukleotide.....	30
2.1.5	Enzyme	30

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.6	Kits	31
2.1.7	Synthetisierte DNA-Sequenzen	31
2.1.8	Plasmide	33
2.1.9	Lösungen und Puffer	33
2.1.10	Medien für die Bakterienkultur	35
2.1.11	Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen	35
2.1.12	Software	36
2.2	Methoden	36
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA	36
2.2.1.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen	37
2.2.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	37
2.2.1.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.2.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.1.6	Sekundärstrukturanalyse von RNA	39
2.2.1.7	Herstellung der Substrat-DNA-Matrices	39
2.2.1.8	Herstellung der MTMR-DNA-Matrix	40
2.2.1.9	<i>In vitro</i> -Transkription	40
2.2.1.10	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	40
2.2.1.11	Elution <i>in vitro</i> -transkribierter RNA	41
2.2.1.12	Quantifizierung radioaktiv markierter RNA	41
2.2.1.13	<i>In vitro</i> -RNA-Prozessierung	42
2.2.1.14	Berechnung der Reaktionsparameter der ribozymatischen Substratspaltung	43
2.2.1.14.1	Initialgeschwindigkeit und beobachtete Spaltrate	43
2.2.1.14.2	Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M und ΔS	45
2.2.1.15	Präzipitation von DNA	47
2.2.1.16	Klonierung des MTMR	47
2.2.1.17	Sequenzierung	48
2.2.1.18	RNA-Isolation	48
2.2.1.19	Reverse Transkription	48
2.2.1.20	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	48
2.2.1.21	Protein-Isolation	49
2.2.1.22	Quantifizierung von Proteinlösungen	49

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1.23	Western Blot.....	50
2.2.1.24	Entwicklung von Filmen	51
2.2.1.25	Dokumentation	51
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	53
2.2.2.1	Kultur von Bakterien	53
2.2.2.2	Transformation von Bakterien.....	53
2.2.3	Arbeit mit eukaryotischen Zellen	54
2.2.3.1	Kultivierung humaner Zellen	54
2.2.3.2	Einfrieren von Zellen.....	54
2.2.3.3	Transfektion von Zellen	54
2.2.3.4	Resistenzbestimmung	55
2.2.3.5	Akkumulation von Zytostatika in Zellen.....	57
2.2.3.6	Immunzytochemische Lokalisation der ABC-Transporter	58
3	ERGEBNISSE.....	59
3.1	Entwicklung eines Multitargetmultiribozymes und Applikation im zellfreien System	59
3.1.1	Auswahl der MTMR-Sequenz.....	59
3.1.2	Autokatalyse des MTMR	63
3.1.3	Multitargetspaltung der Substrate MDR1 _{sub} , BCRP _{sub} , MRP2 _{sub}	65
3.1.4	Abhängigkeit der MTMR-vermittelten Substratspaltung von der Zeit.....	69
3.1.4.1	Initialgeschwindigkeit (v_{ini}) und beobachtete Spaltrate (k_{obs}) der Reaktion.....	72
3.1.5	Abhängigkeit der MTMR-vermittelten Substratspaltung von der MTMR-Konzentration.....	74
3.1.6	Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M	77
3.2	Anwendung des MTMR in verschiedenen Zellsystemen.....	80
3.2.1	Klonierung des MTMR	80
3.2.2	Expression des MTMR in stabilen Transfektanten	80
3.2.3	Zelluläre Effekte der MTMR-Expression	82
3.2.3.1	Expression der ABC-Transporter	82

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3.1.1	Quantitative Analyse der ABC-Transporter mRNA-Expression	82
3.2.3.1.2	Effekt des MTMR auf die ABC-Transporter Proteinexpression.....	84
3.2.4	Zytotoxizität der Ausgangszelllinien und Transfektanten gegenüber verschiedenen Zytostatika.....	86
3.2.5	Akkumulation verschiedenener Zytostatika in Ausgangszelllinien und Transfektanten.....	88
4	DISKUSSION	90
4.1	Idee und Hintergrund der Multitarget-Spaltung.....	90
4.1.1	Das Multitargetmultiribozym-Reaktionssystem.....	91
4.1.2	Konstruktion des MTMRs	92
4.1.3	Auswahl der Ziel-RNA-Sequenzen	94
4.2	Aktivität des <i>in vitro</i> -transkribierten MTMR	94
4.2.1	Bewertung des <i>in vitro</i> -transkribierten MTMRs im zellfreien System	95
4.3	Anwendung des MTMR in verschiedenen Zellsystemen.....	96
4.3.1	Etablierung stabiler MTMR- und Kontroll-Transfektanten der Zelllinien 257RNOV, 257RDB und A2780RCIS	96
4.3.1.1	Auswahl des Vektorsystemes und Klonierung der MTMR-Sequenz	96
4.3.1.2	Generierung stabiler Transfektanten	97
4.3.2	Funktionelle Untersuchungen der Transfektanten	98
4.3.2.1	Resistenzverhalten der Transfektanten	98
4.3.2.2	Akkumulationsverhalten der Transfektanten	100
4.3.3	ABC-Transporter-, „Restaktivität“ und alternative MDR-Mechanismen	101
4.4	Ribozyme <i>versus</i> Antisense-Technologie und RNAi	104
4.5	Ausblick	106
5	LITERATURVERZEICHNIS	108
6	ABKÜRZUNGEN UND KURZDEFINITIONEN	122
7	DANKSAGUNG	125

INHALTSVERZEICHNIS

8	LEBENSLAUF	126
9	PUBLIKATIONEN	127
10	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln von Daunorubicin (A) und Mitoxantron (B)	3
Abbildung 2:	Strukturformel von Cisplatin	5
Abbildung 3:	Mechanismen der Chemoresistenz	7
Abbildung 4:	RNA-Technologien zur Geninhibition	16
Abbildung 5:	Struktur eines <i>Hammerhead</i> -Ribozymes	19
Abbildung 6:	Ribozymatische Spaltung <i>in cis</i> und <i>in trans</i>	21
Abbildung 7:	Vereinfachte kinetische Wege der Ribozymreaktion	23
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des MTMR	61
Abbildung 9:	Sekundärstruktur des MTMR	62
Abbildung 10:	<i>In vitro</i> Transkription der Substrat-RNAs und des MTMR	63
Abbildung 11:	Autokatalyse des MTMR	64
Abbildung 12:	Spezifische Spaltung des Substrates MDR1 _{sub} durch die MTMR-Fragmente MTMRa-e	66
Abbildung 13:	Spezifische Spaltung des Substrates BCRP _{sub} durch die MTMR-Fragmente MTMRa-e	67
Abbildung 14:	Spezifische Spaltung des Substrates MRP2 _{sub} durch die MTMR-Fragmente MTMRa-e	68
Abbildung 15:	MTMR vermittelte Spaltung von der Substrat-RNAs in Abhängigkeit von der Reaktionszeit	71
Abbildung 16:	Der Reaktionsparameter k_{obs} für die Katalyse der Substrat-RNAs	73
Abbildung 17:	Konzentrationsabhängige Reaktionskinetiken der Katalyse der Substrat-RNAs	75
Abbildung 18:	Molarer Stoffumsatz der MTMR-vermittelten Substratspaltung	76
Abbildung 19:	Der Reaktionsparameter $k_{\text{cat}}/k_{\text{M}}$ für die Katalyse der Substrat-RNAs	78
Abbildung 20:	Vektorkarte von pIRES2/MTMR	80
Abbildung 21:	Aldolase- und Vektor-spezifische RT-PCRs	81
Abbildung 22:	Quantifizierung der ABC-Transporter mRNAs	83
Abbildung 23:	Bestimmung des ABC-Transporter-Proteingehaltes durch Western Blots	86
Abbildung 24:	Immunzytochemische Detektion der ABC-Transporter	85

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 25: Zytotoxizität der untersuchten Zelllinien	87
Abbildung 26: Akkumulation von Daunorubicin und Mitoxantron	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemotherapeutika-transportierende ABC-Transporter	9
Tabelle 2:	Plasmide	33
Tabelle 3:	Eukaryotische Zellen	35
Tabelle 4:	PCR-Ansätze	38
Tabelle 5:	Detailangaben für verschiedene PCRs	38
Tabelle 6:	Reaktionsbedingungen bei der RNA-Prozessierung <i>in vitro</i>	42
Tabelle 7:	Antikörper für Western Blots	51
Tabelle 8:	Konzentrationen der im Proliferationsversuch eingesetzten Zytostatika	57
Tabelle 9:	Funktionelle Domänen des anti-ABC-Transporter-MTMR	60
Tabelle 10:	Identifikation der Autokatalyseprodukte MTMRa-e	69
Tabelle 11:	Kinetische Parameter von MTMR-Fragmenten und Monoribozymen	79
Tabelle 12:	ABC-Transporterexpression in MTMR-exprimierenden Zelllinien...	83
Tabelle 13:	IC ₅₀ -Werte und Resistenzfaktoren der untersuchten Zelllinien	88
Tabelle 14:	Relative Stärken und Schwächen verschiedener RNA-Technologien	104

1 **Einleitung**

In der vom Robert-Koch-Institut publizierten Dachdokumentation Krebs wurden für das Jahr 2004 395.000 Krebsneuerkrankungen in Deutschland registriert (www.rki.de; "Krebs in Deutschland"). Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache und werden laut prognostischen Schätzungen in den kommenden Jahren den ersten Platz einnehmen. Nicht nur aufgrund dieser Statistiken sind die Bemühungen um eine verbesserte Krebstherapie enorm; das Spektrum reicht von chirurgischer Entfernung des neoplastischen Gewebes über Strahlentherapie bis hin zur Chemotherapie. Die Suche nach neuen antineoplastisch wirksamen Substanzen stellt eine permanente Aufgabenstellung der Pharmakologie und Krebsforschung dar. Häufig verursachen jedoch die eingesetzten Therapeutika ungewollte, die Gesundheit des Patienten stark beeinträchtigende Nebenwirkungen, wobei noch hinzukommt, daß Resistenzen der Krebszellen gegen die eingesetzten Medikamente eine effiziente Therapie verhindern. Die Ursachen einer Krebserkrankung liegen in genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorzellen im Vergleich zu nicht entarteten Zellen. Für die Entwicklung neuer wirksamer Medikamente ist es daher erstens maßgeblich, Gene, die speziell in Tumorzellen ausgebildet werden und im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, zu identifizieren und zweitens, neue Wege zu erschließen, solche Krebs-assoziierten Gene gegebenenfalls spezifisch, effizient und nebenwirkungsfrei auszuschalten, um damit die Heilungschancen von Patienten zu erhöhen. Um dieser Zielsetzung gerecht zu werden, ist die Entwicklung neuer Behandlungsformen, beispielsweise der Gentherapie, unumgänglich. Der Begriff Gentherapie umfaßt das Einbringen von Konstrukten in die Zielzellen, die der Erkrankung von Patienten durch die Veränderung von Genexpressionen auf molekularer Ebene entgegenwirken sollen. Die gentherapeutisch eingebrachten Konstrukte können vielgestaltig sein. Eine Möglichkeit, Gene mit Hilfe von künstlich in die Zielzellen eingebrachten Molekülen auszuschalten bieten RNA-Technologien. Dabei können Transkripte von spezifischen Genen durch Bindung von einer komplementären RNA verändert und infolgedessen in den Zielzellen abgebaut werden. Die Expression des Zielgens kann somit verhindert werden.

Die nachfolgenden Kapitel gehen auf die Chemotherapie von Tumoren und die Wirkweise einiger in der Arbeit verwendeter Therapeutika sowie die Mechanismen

von Chemoresistenz ein. Desweiteren werden die grundlegenden Eigenschaften von Ribozymen sowie ihre Verwendung als neue Medikamente in der Gentherapie von Krebserkrankungen diskutiert.

1.1 Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumoren

Tumorerkrankungen können im wesentlichen durch chirurgische Entfernung des entarteten Gewebes, durch Bestrahlung und durch den Einsatz von chemotherapeutisch wirksamen Substanzen behandelt werden. Insbesondere für lokal nicht begrenzte Tumoren, wie Leukämien, oder viele durch Absiedlung von Zellen aus dem Primärtumor entstehende Metastasen stellt die Entwicklung systemisch wirksamer Arzneimittel eine wesentliche Erweiterung der Möglichkeiten in der Krebstherapie dar und hat zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse beigetragen. Häufig werden in der adjuvanten Tumorthherapie sogenannte Zytostatika eingesetzt. Dieser Begriff umfaßt eine chemisch heterogene Gruppe von zytotoxischen Substanzen, die die Teilung funktionell aktiver Zellen verhindern oder verzögern. Entsprechend ihres Eingriffs in den Zellzyklus wird zwischen phasenspezifischen (blockieren eine spezielle Phase des Zellzyklus) und phasenunspezifischen Zytostatika unterschieden. Funktionell können Zytostatika auf vielerlei Weise wirksam werden: etwa indem sie durch Alkylierung von Nukleinsäuren zu Veränderungen der DNA führen (DNA-Quervernetzung, Basen-Fehlpaarungen etc.), durch Inhibition der Topoisomerasen oder Hemmung der Polymerasen I, III, Primasen, Ligasen, Telomerasen bis hin zu Zellschädigung durch Radikale sowie Interkalation. Dabei ist es möglich, daß die gleiche Substanz über verschiedene Mechanismen den Zellzyklus blockiert.

Das Spektrum an Chemotherapeutika ist heutzutage immens. Allerdings sind die an sie gestellten großen Erwartungen bisher nicht erfüllt worden. Nur wenige Tumore, wie z.B. Wilms-Tumor, akute Leukämien oder testikuläres Karzinom, sind durch Chemotherapie vollständig heilbar. In der Gesamtheit der Krebserkrankungen machen sie nur einen sehr geringen Anteil aus (Neumann, 1992). Bei anderen Tumoren kann die Chemotherapie lebensverlängernd wirken, etwa beim Ovarialkarzinom, Brustkrebs oder Prostatakarzinom. Bei zahlreichen anderen Krebserkrankungen, darunter den am häufigsten vorkommenden Entitäten, wie dem metastasierenden

Bronchial- oder Mammakarzinom, ist eine Lebensverlängerung bisher nicht möglich (Neumann, 1992; Zeller und zur Hausen, 1995).

Nichtsdestoweniger werden auf dem Gebiet der Chemotherapie weiter Fortschritte erzielt. Dazu zählen neue Erkenntnisse über die Proliferationskinetik von Tumoren und den Wirkmechanismus der meist empirisch gefundenen zytostatischen Stoffe sowie die Resistenzmechanismen der Krebszellen. Durch Kombination von Wirkstoffen, wie sie in der Polychemotherapie von Tumoren angewandt werden, lassen sich die Therapieergebnisse deutlich verbessern (Neumann, 1992; Licht, 1998). Aus der Vielzahl von zytostatisch wirksamen Substanzen sollen in den folgenden Kapiteln drei Vertreter, die in der Arbeit Verwendung fanden, kurz vorgestellt werden.

1.1.1 Daunorubicin und Mitoxantron

Daunorubicin zählt strukturell zu den Anthrazyklinen und besteht aus einer tetrazyklischen Ringverbindung, die Quinon-Hydroquinon-Gruppen enthält. Ein Zuckermolekül, das Daunosamin, ist zudem an die Ringverbindung glykosidisch gebunden (s. Abb. 1). Die Aufnahme des Anthrazyklins in die Zelle erfolgt über Diffusion.

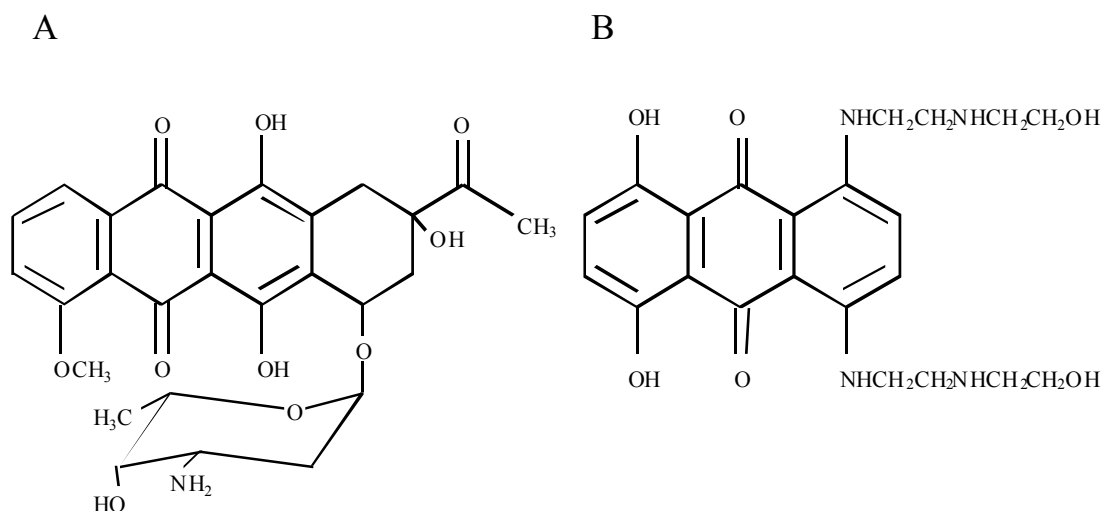


Abbildung 1: Strukturformeln von Daunorubicin (A) und Mitoxantron (B)

Daunorubicin wird vorwiegend in akuten lymphoblastischen und myoblastischen Leukämien angewendet. Trotz der verschiedenen Einsatzmöglichkeiten wird eine erfolgreiche Anwendung des Anthrazyklins durch die Ausbildung von

EINLEITUNG

Resistenzmechanismen in Tumorzellen sowie durch seine hohe toxische Wirkung auf gesundes Gewebe, welches sich in erster Linie in chronischer Kardiomyopathie und kongestivem Herzversagen äußert, stark beeinträchtigt.

Mitoxantron ist ein synthetisches Anthracendion. Es besteht aus einem planaren Anthrachinonringsystem, an das zwei identische Aminoalkylseitenketten gebunden sind (s. Abb. 1). Die Aufnahme von Mitoxantron in die Zelle erfolgt über Diffusion. In diesem Zusammenhang wurde eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran nach Mitoxantronakkumulation beobachtet, die sich positiv auf die Zytostatikumsaufnahme auswirkt. Die veränderte Membranpermeabilität begünstigt wahrscheinlich die Assoziation von Mitoxantron und Plasmamembran und führt zur Diffusion der Substanz in die Zelle (Burns *et al.*, 1988).

Mitoxantron wird beispielsweise bei Brustkrebs, Leukämien und androgen-unabhängigen Prostatakarzinomen eingesetzt. Frühe Berichte über Mitoxantron nährten die Hoffnung, daß dieses Anthracendion weniger kardiotoxisch ist als beispielsweise Daunorubicin. Allerdings haben aktuellere Untersuchungen diese Vermutung nicht bestätigt.

Aufgrund der planaren Ringsysteme interkalieren beide Substanzen in Nukleinsäuren und hemmen die RNA- und DNA-Synthese. Außerdem werden die Topoisomerasen I und II inhibiert und die DNA der Zelle permanent geschädigt. Solche DNA-Schäden sind Strangbrüche, Quervernetzungen, Aggregation und Kondensation von DNA und Chromosomenabberationen. Ein Resultat dieser zahlreichen DNA-Schäden ist die Blockierung des Zellzyklus, vor allem in der späten S-Phase. Darüber hinaus werden Makromoleküle alkyliert und Helikasen gehemmt (Neumann, 1992) sowie freie Radikale freigesetzt, die zur Schädigung der DNA und Lipid-Peroxidation führen. Aus den zahlreichen Zellschädigungen resultiert die Induktion von Apoptose (Übersichten: Gewirtz, 1999, Minotti *et al.*, 2004).

1.1.2 Cisplatin

Cisplatin besteht aus einem neutralen, anorganischen, planaren Komplex, bei dem ein zentrales Platinum mit jeweils zwei Chlorid- und Amin-Ionen verbunden ist (s. Abb. 2). Dieser Komplex ist in der Lage, mit der zellulären DNA zu interagieren. Dabei wird das neutrale Cisplatin durch mehrfache spontane Hydratisierungsreaktionen

EINLEITUNG

aktiviert, welche in erster Linie die *cis*-gebundenen Chlorid-Ionen durch Wassermoleküle ersetzen (Kelland, 2000).

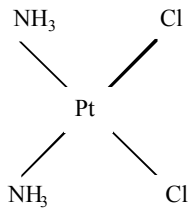


Abbildung 2: Strukturformel von Cisplatin

In der Krebstherapie spielt Cisplatin eine bedeutende Rolle, besonders für die Behandlung von Tumoren des Ovars, der Testis oder Kopf- und Hals-Tumoren (Prestayko *et al.*, 1979).

Die Zytotoxizität von Cisplatin ist primär durch seine Interaktion mit den nukleophilen N7-Atomen in Purinbasen gekennzeichnet. Dadurch entstehen DNA-Protein und DNA-DNA-Interstrang bzw. Intrastrang-Querverbindungen (Eastman, 1987), wobei die Cisplatin-induzierten DNA-Intrastrang-Addukte, die zu großen Läsionen innerhalb eines DNA-Moleküls führen, für die Zytotoxizität von Cisplatin hauptverantwortlich sind (Pinto and Lippard, 1985). Durch die DNA-Intrastrang-Addukte werden zahlreiche Protein-Kaskaden aktiviert, die an derart geschädigte DNA binden (Bellon *et al.*, 1991). Dazu gehören beispielsweise Proteine des zellulären "Mismatch-Repair-Komplexes" (Chaney and Vaisman, 1999). Cisplatin kann daher zum zellulären Arrest in der S- oder G2/M-Phase des Zellzyklus führen. Ebenfalls aktivieren die Cisplatin-induzierten DNA-Schäden apoptotische Signalwege der Zelle, vorrangig über p53, p73 und MAPK (Übersicht: Siddik, 2003).

1.2 Chemoresistenzen von Tumorzellen

Chemotherapeutika sind die effektivste Methode der Behandlung metastasierender Tumoren. Allerdings sind Krebszellen oftmals in der Lage, Chemotherapeutikaresistenzen (kurz: Chemoresistenzen) zu entwickeln, die die Hauptursache für das Scheitern einer Chemotherapie sind und damit die erfolgreiche Behandlung einer Tumorerkrankung verhindern. Unter Chemoresistenz versteht man die im Vergleich zu einer anderen Zelle verminderte Empfindlichkeit einer Zelle

EINLEITUNG

gegenüber einem Zytostatikum. Die Unempfindlichkeit von Tumoren gegenüber Zytostatika ist auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen: Die applizierten Therapeutika sind für den speziellen Tumor ungeeignet, die Medikamentenkonzentrationen am Wirkort sind zu gering oder es wird mit einer Kombination von Substanzen behandelt, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig abschwächen (Pluen *et al.*, 2001; Jain, 2001). Neben diesen Gründen sind fast immer molekulare Mechanismen in den entsprechenden Zytostatika-unempfindlichen Tumorzellen mit dem Auftreten von Chemoresistenz verbunden; diesbezügliche Beispiele sind in der folgenden Auflistung zusammengefaßt und in Abb. 3 schematisch dargestellt (Übersicht: Gottesman, 2002):

1. Aktiver Auswärtstransport durch Ausbildung von Effluxpumpen (d.h. Proteine, die Stoffe aus der Zelle heraustransportieren können)
2. Erniedrigte Zytostatikumsaufnahme
3. erhöhtes Zielmolekül (auf das der Angriff der Zytostatika erfolgt) erhält Zellstoffwechsel aufrecht
4. verändertes Zielmolekül verhindert Zytostatikabindung
5. verstärkte DNA-Reparatur
6. Zytostatikum wird metabolisiert und dadurch unwirksam
7. Verhinderung der Apoptose durch Beeinflussung der Zellzyklus-Kontrolle und Apoptosewege
8. räumliche Trennung des Zytostatikums zum Wirkort (Kompartimentierung)
9. Veränderung der Membranlipidzusammensetzung

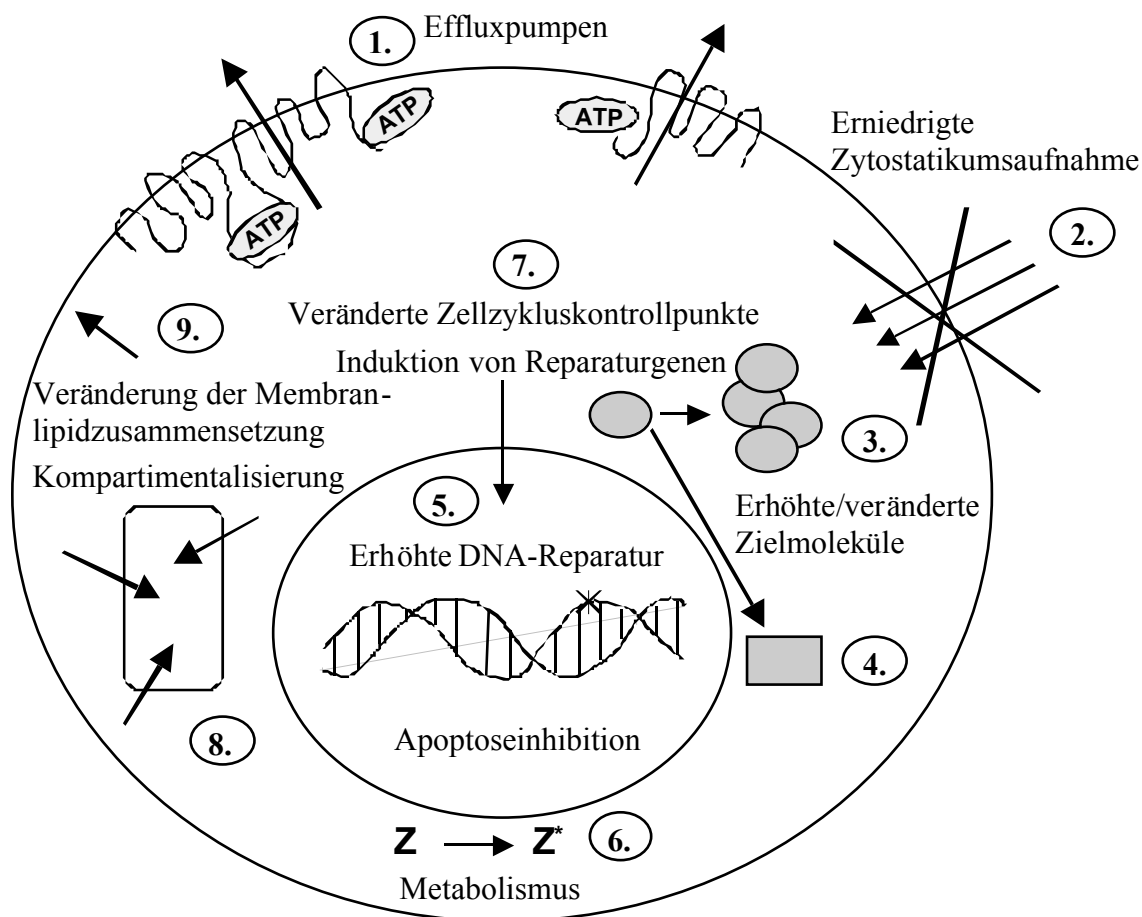


Abbildung 3: Mechanismen der Chemoresistenz (verändert nach Gottesman, 2002)

Z: Zytostatikum

Neben den Chemoresistenzfaktoren, die die Medikamente spezifisch in ihrer Wirkung beeinträchtigen, spielen auch unspezifische Faktoren eine Rolle: Hypoxie, Hitzeschock oder langsames Tumorwachstum (Gottesman, 2002).

Durch Chemoresistenzen können entweder einzelne Klassen von Medikamenten wirkungslos werden oder es tritt eine simultane Resistenz gegen Chemotherapeutika mit unterschiedlicher Struktur und Wirkmechanismen auf (Licht, 1998). Dieses Phänomen wird Vielfachresistenz oder Multidrug-Resistenz, kurz MDR, genannt (Pastan and Gottesman, 1987). Dabei wird zwischen intrinsischer/primärer und erworbener/sekundärer MDR unterschieden (Chin *et al.*, 1993). Intrinsische bzw. primäre MDR liegt dann vor, wenn ein Tumor schon *a priori* eine Vielfachresistenz aufweist. Dies ist häufig bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber und der Niere zu beobachten. Erworbene oder sekundäre MDR tritt erst nach oder während der Chemotherapie auf. Auslöser hierfür sind in der Regel die eingesetzten

Zytostatika selbst, die eine Selektionierung resistenter Tumorzellen hervorrufen. Experimentell und klinisch wurde bestätigt, daß die Expressionen bestimmter Gene auf zellulärer Ebene für die MDR von Tumorzellen verantwortlich sind. Mehrere MDR-verursachende Gene und die Wirkmechanismen ihrer Genprodukte konnten bereits identifiziert werden.

Das zuerst identifizierte MDR-assoziierte Gen wurde nach dem Phänomen der Multidrug-Resistenz als *MDR1* benannt. Vielfachresistenz, die im Zusammenhang mit der Überexpression von *MDR1* steht, wird auch als klassische MDR bezeichnet. Das Genprodukt ist ein integrales Glykoprotein der Plasmamembran (auch Permeabilitätsglykoprotein; P-Gp), das in seiner Funktion als Effluxpumpe in der Lage ist, verschiedenste Chemotherapeutika aus der Zelle herauszutransportieren und daher zelluläre Resistenzen gegenüber diesen Substanzen zu verursachen (s. Kap. 1.2.2.1).

Tumorzellen können jedoch auch andere Mechanismen der Vielfachresistenz aufweisen, die nicht mit der Expression von P-Gp im Zusammenhang stehen und daher als atypische oder P-Gp-unabhängige MDR bezeichnet werden (Moscow and Cowan, 1988; Lage, 1999).

1.2.1 Bedeutung von ABC-Transportern

Bei der *in vitro*-Selektion von Krebszellen mit zytotoxischen Krebsmedikamenten, beispielsweise mit den in der Arbeit verwendeten Substanzen Daunorubicin, Mitoxantron und Cisplatin, wird oftmals ein verstärkter ATP-abhängiger Efflux (Auswärtstransport) der zytotoxischen Substanzen festgestellt, welcher mit der Herausbildung eines MDR-Phänotypes einhergeht. Genauere Untersuchungen in solchen multidrug-resistenten Zellen haben ergeben, daß ABC-Transporter an der Ausbildung der MDR beteiligt sind.

Die Superfamilie der ABC-Transporter ist eine der größten Proteinfamilien und in allen Organismenbereichen vertreten (Archaea, Bacteria und Eukarya). Die Bezeichnung ABC-Transporter basiert auf dem Vorhandensein der hochkonservierten ATP-Bindungskassette (ATP-Binding Cassette) (Higgins, 1992). Die Kassetten (oder funktionelle Domänen) sind die Grundlage für einen energiegekoppelten Substrattransport (Schneider and Hunke, 1998) entgegen einem Konzentrationsgradienten. In der Primärstruktur der zytoplasmatischen ATP-

EINLEITUNG

bindenden Kassetten befinden sich zwei hochkonservierte Sequenzmotive, die als "Walker Boxen A und B" bezeichnet werden und eine Nukleotidbindetasche bilden (Walker *et al.*, 1982).

Im humanen Genom wurden bisher 48 ABC-Transportergene identifiziert (Dean *et al.*, 2001). Aufgrund von Aminosäuresequenzanalysen ihrer ATP-bindenden Domänen wurden sie in sieben Unterfamilien eingeteilt, die mit ABCA-ABCG bezeichnet werden. Die Gene einer Unterfamilie weisen neben Homologien der ATP-Bindedomäne auch meist Übereinstimmungen in den Transmembrandomänen auf.

Die humanen ABC-Transporter fungieren als zelluläre Effluxpumpen zur Kontrolle intrazellulärer Konzentrationen potentiell schädlicher Substanzen. Sie haben dabei insgesamt ein breites Spektrum an Stoffklassen, die von ihnen durch Membranen transportiert werden können: Ionen, Phospholipide, Polysaccharide, Steroide, Aminosäuren, Gallensalze und Peptide für die Antigenpräsentation. Aufgrund ihrer Substratspezifität kommt dabei einigen ABC-Transportern neben ihrer physiologischen Funktion eine bedeutende Rolle beim Transport von Medikamenten und deren Metaboliten zugute, was zur Ausbildung von Mehrfachresistenzen führen kann. Bislang konnte für 13 humane ABC-Transporter ein Transport von Chemotherapeutika nachgewiesen werden, von denen jedoch nicht alle zwangsläufig Vielfachresistenzen in Tumorzellen verursachen.

In der nachstehende Tabelle werden die 13 ABC-Transporter genannt, deren Substratspektrum Chemotherapeutika einschließt. Dabei werden sowohl die Subfamilienzuordnungen aufgeführt als auch die Trivial- oder Kurzbezeichnungen, welche in zahlreichen Publikationen zu finden sind.

Tabelle 1: Chemotherapeutika-transportierende ABC-Transporter

ABC-Transporter Subfamilie	Kurzbezeichnung	Name und Referenz
ABCB1	MDR1/P-Gp	<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance Protein 1 / <u>P</u> - <u>G</u> lycoprotein (Juliano and Ling, 1976)
ABCB2-3	TAP1-2	<u>T</u> ransporter associated with <u>A</u> ntigen <u>P</u> rocessing 1-2 (Lage <i>et al.</i> , 2001)
ABCB11	SPGP	<u>S</u> ister of <u>P</u> - <u>G</u> p (Childs <i>et al.</i> , 1998)
ABCC1-6; ABCC10-12	MRP1-6; MRP7-9	<u>M</u> DR associated <u>P</u> rotein 1-9 (Übersicht zu MRP1-6 in: Leonard <i>et al.</i> , 2003; MRP7-8: Augustine <i>et al.</i> , 2005; MRP9: Yasui <i>et</i>

al., 2004)

ABCG2	BCRP/MXR/ABCP	<i>Breast Cancer Resistance Protein / Mitoxantrone Resistance / ATP-Binding Cassette Placenta</i> (Doyle <i>et al.</i> , 1998)
-------	---------------	--

Von den in Tab. 1 aufgeführten ABC-Transportern sind nur einige für die Entstehung von Vielfachresistenzen in Tumorzellen beteiligt, u.a. MDR1/P-Gp, MRP2 und BCRP, auf die die folgenden Kapitel genauer eingehen.

1.2.2 Die ABC-Transporter MDR1/P-Gp, BCRP und MRP2

1.2.2.1 MDR1/P-Gp/ABCB1

Oftmals wird in kultivierten und mit einem bestimmten Therapeutikum selektionierten Tumorzellen Multidrug-Resistenz aufgrund der Expression eines membranständigen ABC-Transporters, dem P-Glykoprotein (P-Gp), beobachtet. P-Gp wurde 1976 von Juliano und Ling als Genprodukt des *MDR1*-Genes beschrieben (Juliano and Ling, 1976). Dieser Transporter gehört als ABCB1 zur B-Unterfamilie der ABC-Proteine. Das *MDR1*-kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 7q21.1. MDR1/P-Gp ist in unterschiedlichen normalen humanen Geweben, meist exkretorischer Art wie Niere, Leber und Darm ausgebildet und nimmt eine bedeutende Rolle bei der zellulären Sekretion von Steroiden und potentiell gefährlichen Metaboliten ein. In Mäusen existieren zum humanen *MDR1* homologe Gene, die als *Abcb1a* und *Abcb1b* bezeichnet werden. In sogenannten *knock-out* Experimenten, bei denen diese Gene in den entsprechenden Mäusen homozygot ausgeschaltet wurden, zeigte sich ein vorerst normaler Phänotyp, der jedoch extrem anfällig gegenüber neurotoxischen Substanzen ist (Schinkel *et al.*, 1994 und 1997). Durch diese Studien wurde deutlich, daß MDR1/P-Gp ein bedeutender Transporter an der Blut-Hirn-Schranke ist. Darüber hinaus wurde das Gen in Stammzellen exprimiert gefunden, wo es ebenfalls eine Schutzfunktion gegen toxische Substanzen einnimmt. Neben dieser natürlichen Funktion des MDR1/P-Gp kann seine Expression in der Chemotherapie bei Krebspatienten zu Resistenzen führen und damit eine erfolgreiche Behandlung unterbinden (Schellens *et al.*, 2000). Die Expression des MDR1/P-gp ist vielfach in humanen Tumoren nachgewiesen worden, u.a. in Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Leber, Pankreas), Tumoren des hämatopoetischen Systems

(Myelom, Lymphom, Leukämien), Tumoren des Urogenitalsystems (Niere, Ovar, Testis) und bei Krebserkrankungen von Kindern (Neuroblastom, Fibrosarkom) (Goldstein *et al.*, 1989). Aus Studien an unterschiedlichen Patientenkollektiven geht hervor, daß die Expression des *MDR1*-Genes mit der Entwicklung von Multidrug-Resistenz stark korreliert und demzufolge eine Inhibition des Genproduktes eine positive Wirkung auf den Erfolg einer Chemotherapie hat (Tidefelt *et al.*, 2000; Surowiak *et al.*, 2005).

1.2.2.2 BCRP/ABCG2

In verschiedenen multidrug-resistenten Zelllinien, die nicht MDR1/P-Gp oder einen MRP-Transporter exprimieren, konnte ein ATP-abhängiger Efflux bestimmter Zytostatika festgestellt werden. Diese Beobachtung führte zur Identifizierung eines neuen Mitgliedes der G-Unterfamilie der ABC-Transporter, dem ABCG2. Aufgrund seiner Erstbeschreibung in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7/AdrVp wurde der Transporter *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) genannt (Doyle *et al.*, 1998). Parallel wurde derselbe Transporter auch von anderen Gruppen entdeckt, so daß auch die Abkürzungen MXR für *Mitoxantrone Resistance*-Protein (Miyake *et al.*, 1999) und ABCP für *ABC*-Transporter in Plazenta-Gewebe (Allikmets *et al.*, 1998) Verwendung fanden. Das humane *BCRP*-Gen ist auf Chromosom 4q22 lokalisiert (Knutsen *et al.*, 2000). In Tumorzellen kann die alleinige Ausbildung von BCRP zu einem MDR-Phänotyp führen (Doyle *et al.*, 1998, Ross *et al.*, 1999). Das BCRP hat ein Molekulargewicht von 72 kDa und ist in der zellulären Plasmamembran lokalisiert (Litman *et al.*, 2000; Rocchi *et al.*, 2000). Wie alle Mitglieder der G-Unterfamilie ist BCRP ein Halbtransporter. Um funktionelle Wirksamkeit zu erlangen, muß BCRP als Dimer vorliegen. Unterschiedliche Gruppen konnten für BCRP Homodimere nachweisen, was bislang einmalig für einen Vertreter der ABC-Transporter G-Subgruppe ist (Ozvegy *et al.*, 2001 und 2002; Kage *et al.*, 2002; Litman *et al.*, 2002). In Mäusen existiert ein zum humanen *BCRP* homologes Gen, welches als *bcrp1* bzw. *abcg2* bezeichnet wird (Allen *et al.*, 1999). Mit Hilfe von *bcrp1* knock-out-Mäusen konnte nachgewiesen werden, das BCRP *in vivo* einerseits eine protektive Rolle vor Umwelt- und Nahrungsmittel-Xenotoxinen ausübt, andererseits aufgrund seiner Expression im Brustdrüsengewebe die Sekretion von toxischen Stoffen in die Muttermilch verursacht (Breedveld *et al.*, 2005; Jonker *et al.*, 2005; van Herwaarden *et al.*, 2006). Die biologische Bedeutung dieser paradox erscheinenden Wirkweise ist

noch nicht abschließend geklärt. Bei Krebspatienten mit akuter myeloider Leukämie korrelierte die Expression von BCRP mit dem Auftreten von Multidrug-Resistenz signifikant (Ross *et al.*, 2000; Sargent *et al.*, 2001; Steinbach *et al.*, 2002). BCRP-Inhibitoren bewirken in Zellkulturen (Kowalski *et al.*, 2002, 2004, 2005) sowie in Patienten eine Reversion des MDR-Phänotypes und stellen demzufolge eine Verbesserung der Effektivität der Chemotherapie dar (Lee 2004; Übersichtsartikel zu BCRP: Sarkadi *et al.*, 2004; Lepper *et al.*, 2005; Staud and Pavek, 2005).

1.2.2.3 MRP2/ABCC2

Das *MDR-associated Protein 2*, MRP2, ist in den kanalikulären Hepatozyten beim Menschen exprimiert (Kool *et al.*, 1997). Es fungiert als ein Haupttransporter für organische Anionen von der Leber in die Galle, was die alternative Bezeichnung *canalicular multiple organic anion transporter* (cMOAT) widerspiegelt (Sparreboom *et al.*, 2003). Als ABCC2 ist es der C-Unterfamilie der humanen ABC-Transporter zugehörig. Das humane *MRP2*-Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert. In Patienten mit dem Dubin-Johnson-Syndrom (Dubin and Johnson, 1954) ist das *MRP2*-Gen mutiert, was zu einer Störung des Transportes von organischen Ionen führt (Wada *et al.*, 1998). In geringem Maße wurde *MRP2*-Expression in Nierenkanälen, Darmenterozyten, Plazentagewebe und Hirnkapillaren festgestellt, was auf eine ähnliche Schutzfunktion wie beim P-Gp bzw. BCRP hindeutet (Kruh and Belinsky, 2003). Neben der natürlichen Funktion von MRP2 wurde eine Überexpression dieses ABC-Transporters in Tumorzellen im Zusammenhang mit dem Heraustransport von verschiedenen Chemotherapeutika beobachtet (Borst *et al.*, 2000). Besonders der Transport des Zytostatikums Cisplatin, welches in der Tumorthérapie vielfältig zum Einsatz kommt, unterscheidet MRP2 von allen anderen Mitgliedern der MRP-Familie (Taniguchi *et al.*, 1996). In verschiedenen Cisplatin-resistenten Zelllinien zeigte sich eine Überexpression des Transporters (Taniguchi *et al.*, 1996; Materna *et al.*, 2005). MRP2 wurde auch in unterschiedlichen humanen Tumorentitäten, wie kolorektales Karzinom, Brustkrebs und Leukämien, Ovarialkarzinom identifiziert (Kruh and Belinsky, 2003). In einer Studie mit Krebspatienten mit akuter myeloider Leukämie korrelierte die Expression von MRP2 signifikant mit dem Auftreten von Chemoresistenz (Steinbach *et al.*, 2003). Im Einklang mit diesen Befunden wurde in einer MRP2-überexprimierenden Ovarialkarzinomzelllinie mit Hilfe von

Hammerhead-Ribozymen die spezifische Cisplatinresistenz revertiert (Materna *et al.*, 2005).

1.2.3 Tumorzelllinien als Untersuchungsmodelle für Resistenzmechanismen

Zur experimentellen Identifikation von Resistenzmechanismen benutzt man häufig Tumorzelllinien, bei denen eine parentale Zelllinie schrittweise steigenden Konzentrationen eines Zytostatikums ausgesetzt ist und somit eine resistente Variante dieser Ausgangszelllinie etabliert wird. Ein wesentliches Merkmal der selektionierten Zelllinie ist, dass die erworbene Resistenz auch bei Kultivierung ohne Zytostatikum stabil erhalten bleibt. Zur Bestimmung der Resistenz einer Zelllinie dienen Proliferations- und Klonogenitätsassays. Unter den Proliferationsassays sind der Sulforhodamin B- und der MTT-Test etabliert (SRB- bzw. MTT-Assay; Skehan *et al.*, 1990; Mosmann, 1983), wobei der auf einer Proteinfärbung basierende SRB-Assay am deutlichsten mit der Zellzahl korreliert und daher bevorzugt Anwendung findet (Perez *et al.*, 1993; Fricker and Buckley, 1996). Diese Methode ermöglicht die Ermittlung des IC₅₀-Wertes (*Inhibitory Concentration 50*), mit dem diejenige Zytostatikumskonzentration gemeint ist, bei der verglichen mit der unbehandelten Kontrolle die Hälfte der kultivierten Zellen wachstumsinhibiert oder abgestorben sind. Der multiplikative Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten von parentaler und resistenter Zelllinie wird als Resistenzfaktor bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Zelllinienmodelle verwendet. Davon entstammen zwei Zelllinien-Paare der gleichen chemosensiblen, parentalen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P (kurz: 257P), die im Jahre 1985 im Hamburger Universitätsklinikum Eppendorf von einem Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens etabliert wurde. Durch Selektion mit Daunorubicin sind aus ihr die klassische multidrug-resistente Zelllinie EPG85-257RDB (kurz: 257RDB) und durch Mitoxantronselektion die atypisch multidrug-resistente Zelllinie EPG85-257RNOV (kurz: 257RNOV) etabliert worden (Dietel *et al.*, 1990; Lage *et al.*, 2000). In der klassisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RDB ist der ABC-Transporter MDR1/P-Gp und in der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RNOV ist BCRP im Vergleich zur parentalen Zelllinie 257P überexprimiert. Beim dritten Zellkulturmodell handelt es sich um die parentale, chemosensible Ovarialkarzinomzelllinie A2780P, die

EINLEITUNG

im Jahre 1982 aus einer Patientin mit Ovarialkarzinom etabliert wurde (Eva *et al.*, 1982). Durch Selektion mit dem Zytostatikum Cisplatin konnte aus ihr die atypisch multidrug-resistente Variante A2780RCIS etabliert werden, die den ABC-Transporter MRP2 im Vergleich zur parentalen Zelllinie verstärkt ausbildet (Materna *et al.*, 2005).

1.3 RNA-Technologien zur Genregulation

1978 stellten Stephenson und Zamecnik eine neue Klasse von Wirkstoffen vor, bei denen Oligonukleotide durch komplementäre Bindung einer viralen Ziel-RNA (*Rous-Sarcoma-Virus*) anti-virale Aktivität entwickeln konnten (Stephenson and Zamecnik, 1978). Es dauerte einige Jahre bis die Bedeutung dieser auf die alleinige Wirkung von RNA basierenden Entdeckung zur Geltung kam, da vor allem die hohen Kosten und geringen Ausbeuten bei der Produktion von Nukleinsäuremolekülen zu starken Limitationen führten. Nichtsdestoweniger wurde 1999 das erste medikamentös wirksame *Antisense*-Oligonukleotid, Fomivirsen (ISIS Pharmaceuticals, CA, USA), auf dem US-Markt zugelassen. Mit Hilfe der Grundlagenforschung haben sich das Spektrum und die Anwendungsbereiche von RNA-Technologien stark erweitert: angefangen von *Antisense*-DNA-Oligonukleotiden, Ribozymen, Triplex-formierende Oligonukleotiden bis hin zu DNAsymen, Aptameren, Decoys, *small interfering* RNAs (siRNAs) und CpG-Oligonukleotiden. Allen genannten RNA-Technologien ist gemeinsam, daß die zur Anwendung gebrachten Moleküle Sequenzen enthalten, die zu Teilen einer mRNA oder anderen Ziel-RNA komplementär sind (Übersichten in: Giles, 2000; Dias and Stein, 2002). Daher können sie als wertvolle Agenzien zur spezifischen Geninhibition, beispielsweise in der funktionellen Genomanalyse, zur Bewertung von bestimmten Genen und für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Unter den RNA-Technologien sind sowohl in der Grundlagenforschung als auch in pharmakologischen oder biotechnologischen Anwendungen *Antisense*-DNA-Oligonukleotide, katalytisch aktive RNA-Oligonukleotide, sogenannte Ribozyme, und Moleküle, die mittels RNA-Interferenz wirksam sind, mittlerweile am häufigsten vertreten. Abb. 5 geht auf die Wirkweise dieser RNA-Technologien ein.

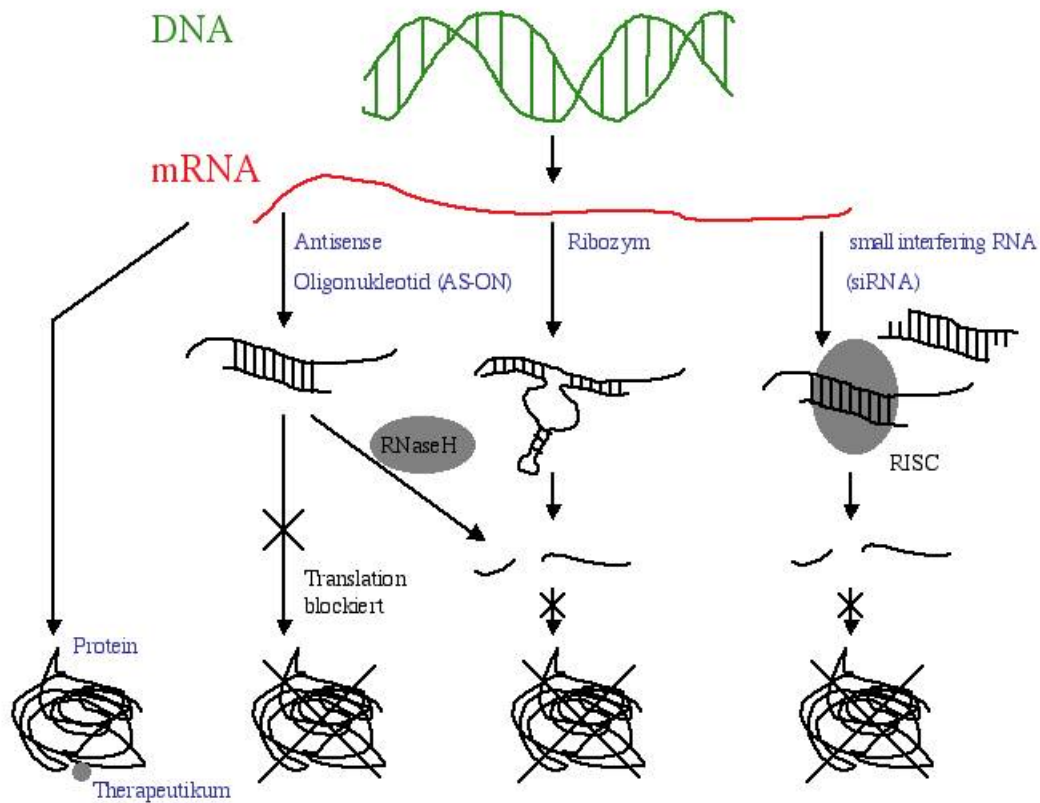


Abbildung 4: RNA-Technologien zur Geninhibition (verändert nach: Kurreck, 2003)

Dargestellt sind verschiedene RNA-Technologien zur Inhibition spezifischer Genexpressionen. Während die meisten Therapeutika direkt an ein Protein binden, wirken alle RNA-Techniken über die komplementäre Basenpaarung mit der Ziel-RNA. *Antisense*-Oligodesnukleotide (AS-ODN) blockieren die Translation der mRNA oder induzieren ihre Degradation mit Hilfe der RNase H. Ribozyme degradieren die Ziel-RNA durch Bindung und Spaltung. RNA-Interferenz wirkt über kleine *small interfering*

RNA-Moleküle (siRNAs), die mit Hilfe eines sogenannten RISC-Proteinkomplexes komplementär an die Ziel-RNA binden, wodurch diese degradiert wird.

1.3.1 *Antisense*-Oligodesnukleotide (AS-ODN)

Antisense-Oligodesnukleotide (AS-ODN) bestehen in der Regel aus 15-20 DNA-Nukleotiden, die komplementär zur Ziel-RNA sind. Sie wirken über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen können spezielle AS-ODN die zelleigene RNase H rekrutieren, die den RNA-Anteil von zellulären DNA-RNA-Heteroduplexen schneidet, welches zur Degradation der Ziel-RNA führt. Modifizierte AS-ODN prozessieren ihre Ziel-RNA (meist tRNA) mit Hilfe der RNasen L oder P. Zum anderen können AS-ODN, die nicht über einen RNase-vermittelten Mechanismus wirken, durch sterische Hinderung des Ribosomes die Translation der mRNA

blockieren (Übersichten in: Kurreck, 2003; Scherer and Rossi, 2003; Goodchild, 2004).

1.3.2 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) wird von den RNA-Technologien derzeit am intensivsten untersucht. Es handelt sich dabei um einen natürlich vorkommenden Mechanismus für sequenzspezifische posttranskriptionelle Geninhibition, der zuerst an dem Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurde (Fire *et al.*, 1998). RNAi wird durch lange doppelsträngige RNA-Moleküle ausgelöst, die mit Hilfe eines sogenannten *Dicer*-Enzymes zu kleinen Doppelstrang-RNAs von 21-25 Nukleotiden Länge prozessiert werden. Das *Dicer*-Enzym ist ein RNase III-Protein, welches beide RNA-Stränge spaltet und dabei jeweils 2 Nukleotide am 3'-RNA-Strang als Überhang läßt. Diese kleinen doppelsträngigen RNAs werden als *short interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet. Sie integrieren in einen als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichneten Protein-RNA-Komplex, der in der Lage ist, die Ziel-RNA komplementär zum *Antisense*-Strang der siRNA zu spalten. Dieser konservierte biochemische Mechanismus konnte vorerst nicht in humanen Zellen zur Anwendung kommen, da die langen doppelsträngigen RNAs eine starke Induktion von Interferonen auslösten. Einen Durchbruch brachten die Wissenschaftler um Tuschl, indem sie zeigten, daß 21-Nukleotid RNA-Duplexe mit 3'-Überhängen zur spezifischen Geninhibition in humanen Zellen verwendet werden können (Elbashir *et al.*, 2001). Mittlerweile gibt es Möglichkeiten, den Mechanismus der RNAi permanent in Zellen einzusetzen, z.B. mit Hilfe von *short hairpin RNAs* (shRNAs) (Übersichten in: McManus and Sharp, 2002; Tuschl 2002).

1.3.3 Ribozyme

Spezielle RNA-Moleküle sind in der Lage, die Ziel-RNA ohne die Assistenz von zelleigenen RNasen zu spalten. Diese Eigenschaft basiert auf natürlich vorkommenden RNA-Enzymen, hauptsächlich vom sogenannten *Hammerhead*-Typ, die Cech *et al.* in den frühen 1980er Jahren entdeckten und mit dem Terminus "Ribozym" beschrieben (Cech *et al.*, 1981). In den darauffolgenden Jahren fand man weitere natürlich vorkommende katalytische RNAs, beispielsweise *Hairpin*-,

Hepatitis Delta Virus- Ribozyme und *Varkud Satellite*-RNA, *Group I*- und *Group II*- Introns, die RNA-Untereinheit der RNaseP (Guerrier-Takada *et al.*, 1983), Anteile der ribosomalen RNA sowie RNA-Komponenten des Spliceosoms (Übersichten in: James and Gibson; 1998; Sun *et al.*, 2000; Doudna and Cech, 2002).

Die Katalysereaktion kann in drei Schritte eingeteilt werden:

1. Assoziation von Ribozym- und Ziel-RNA über komplementäre Basenpaarung.
2. Spaltung der Ziel-RNA.
3. Dissoziation des Ribozym-Substrat-Komplexes.

Die Substratspaltung ermöglicht ein sogenanntes „katalytisches Zentrum“, welches sich innerhalb des Ribozymmoleküles befindet (unabhängig von der Ribozymklasse). Liegen Spaltprodukte und Ribozym dissoziiert vor, kann das Ribozym ein weiteres Substratmolekül katalysieren.

Die vorliegende Arbeit stellt die Entwicklung eines *Hammerhead*-Ribozymsystems zur Geninhibition verschiedener Zielgene vor, so daß die nachfolgenden Kapitel speziell auf *Hammerhead*-Ribozyme eingehen sowie Anwendungen der Ribozymtechnologie vorstellen.

1.3.3.1 *Hammerhead*-Ribozyme

Die *Hammerhead*-Ribozyme sind erstmals als selbst-spaltende Sequenzen innerhalb von pflanzen-infizierenden Viroid-RNAs beschrieben worden (Hutchins *et al.*, 1986; Buzayan *et al.*, 1986). Analysen der Nukleotidsequenz in diesen Viroid-RNAs zeigten, daß die Nukleotide um die Schnittstelle zum einen hochkonserviert sind und zum anderen mit der Ziel-RNA eine typische Struktur ausbilden, die in zweidimensionaler Abbildung an einen Hammerkopf-Hai erinnert und daher die Bezeichnung "*hammerhead*" erhielt. Die *Hammerhead*-Struktur enthält einen hochkonservierten katalytischen Kern, in dem eine Helix (Helix II, Abb. 5) und einzelsträngige Verbindungsnukleotide angeordnet sind. Darüber hinaus sind für die Ziel-RNA-Bindung zwei flankierende Sequenzen erforderlich, die über komplementäre Basenpaarungen mit der Ziel-RNA zwei weitere Helices ausbilden (Helices I und III, Abb. 5).

EINLEITUNG

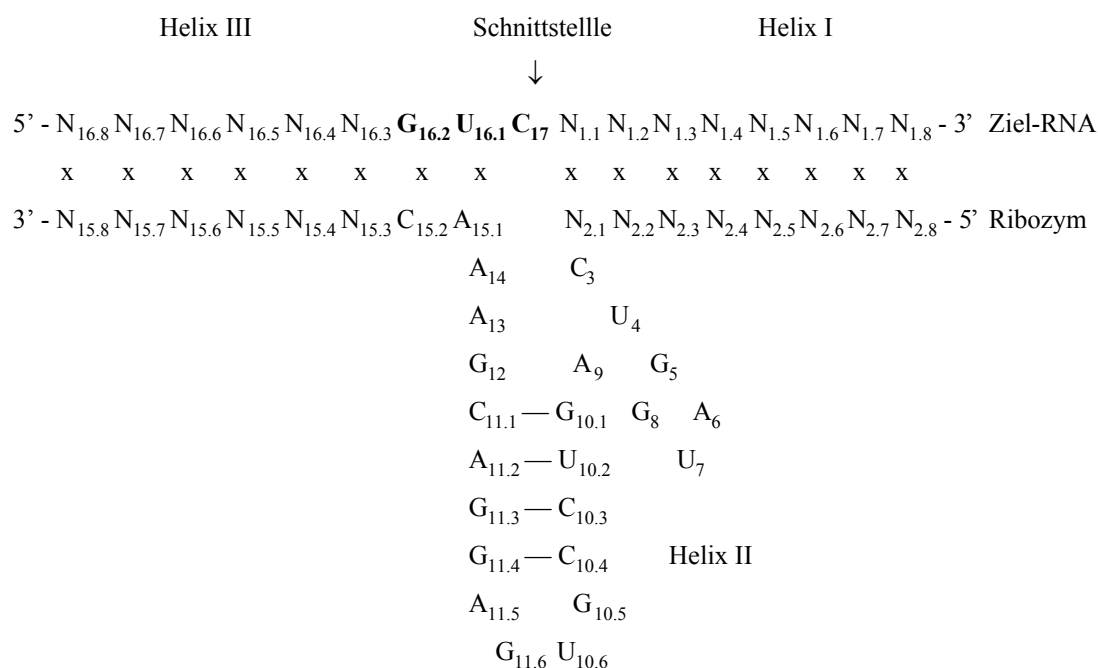


Abbildung 5: Struktur eines *Hammerhead*-Ribozymes

Aufbau eines *Hammerhead*-Ribozymes mit der Nummerierung nach Hertel *et al.*, 1992.

Mit der Information über die konservierten Nukleotide im katalytischen Zentrum des *Hammerhead*-Ribozymes und über die Anforderungen an das Schnittmotiv in der Ziel-RNA synthetisierte Uhlenbeck das erste künstliche *Hammerhead*-Ribozym (Uhlenbeck, 1987). Die Substrat-RNA sollte ein sogenanntes NUX-Triplett enthalten, welches vom *Hammerhead*-Ribozym als katalytisches Motiv erkannt und am 3'-Ende gespalten wird. Hierbei entspricht N jedem beliebigen Nukleotid (A, U, C, G) und X den Nukleotiden A, U oder C. Nicht immer ist die Spaltreaktion nach einem NUX-Motiv gewährleistet, doch in vielen Analysen konnte nach einem GUC-Triplett eine ribozymatische Katalyse beobachtet werden (Perriman *et al.*, 1992; Shimayama *et al.*, 1995; Zoumadakis and Tabler, 1995). Die 5'-NU- und 3'- benachbarten Sequenzen des Spalttriplets hybridisieren über komplementäre Basenpaarung mit den Armen des jeweiligen *Hammerhead*-Ribozymes. Die Länge dieser Hybridisierungssequenz ist abhängig von den Anforderungen an das Ribozym. Zum einen sorgt allein diese Sequenz für die Spezifität der ribozymatischen Spaltreaktion und sollte daher nicht zu kurz gewählt sein, um unspezifische Bindungen und Katalysen zu verhindern. Andererseits wird die Reaktionsrate vermindert, je länger die Hybridisierungsarme eines Ribozymes sind, da dadurch die Dissoziation des Ribozymes vom Substrat erschwert wird. Die optimalen Bedingungen müssen für jedes *Hammerhead*-Ribozym

EINLEITUNG

im einzelnen empirisch getestet werden, jedoch erreicht man im Allgemeinen den besten Kompromiß zwischen Spezifität und Reaktionsrate bei einer Gesamtlänge der Hybridisierungssequenz von 12-20 bp (Fedor and Uhlenbeck, 1992; Goodchild and Kohli, 1991; Heidenreich and Eckstein, 1992).

Hammerhead-Ribozyme können die Spaltung von RNA bis um das Achtfache gegenüber der spontanen Hydrolyse erhöhen (Fedor and Uhlenbeck, 1992). Die Reaktion erfordert kein ATP und ist irreversibel. Unter geeigneten Konditionen können *Hammerhead*-Ribozyme wie richtige Katalysatoren auftreten, indem sie mehr als ein Substratmolekül spalten. Die katalytische Aktivität von *Hammerhead*-Ribozymen ist in der Regel abhängig vom Vorhandensein bivalenter Metall-Ionen, von denen Mg^{2+} in den meisten Versuchen in zellfreien Systemen in Konzentrationen zwischen 10 und 20 mM eingesetzt wird. Mn^{2+} oder Ca^{2+} können das Mg^{2+} substituieren. Die Ionen sind für die korrekte Ausbildung der Ribozym-Sekundärstruktur verantwortlich und partizipieren direkt in der Katalysereaktion (Dahm and Uhlenbeck, 1991; Hertel *et al.*, 1994; Bassi *et al.*, 1996; Bassi *et al.*, 1997). Dennoch können Spaltreaktionen beim Vorhandensein extrem hoher Ionenstärken auch ohne divalente Kationen stattfinden (Murray *et al.*, 1998).

Obwohl das *Hammerhead*-Ribozym das am besten untersuchte Ribozym ist, ist der Katalysemechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Nichtsdestoweniger wurden *Hammerhead*-Ribozyme bereits vielfältig *in vitro* und *in vivo* angewendet. Es hat sich in den experimentellen Analysen herausgestellt, daß die Erreichbarkeit des Spalttripletts in der Substrat-RNA für das Ribozym der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und daher auch der entscheidende Faktor für die erfolgreiche Anwendbarkeit eines *Hammerhead*-Ribozymes ist. Aus diesem Grund sind diejenigen Spalttripletts in der Substrat-RNA bei der ribozymatischen Katalyse bevorzugt, die in sogenannten Schleifen-Strukturen angesiedelt und daher räumlich gut erreichbar sind (Übersichten in: James and Gibson, 1998). Heutzutage können computergestützte RNA-Sekundärstruktur-Algorithmen *a priori* Wahrscheinlichkeitsprofile für die räumliche Lage einzelner Nukleotide in einer RNA-Sequenz erstellen. Diese Programme sind als Grundlage für die experimentelle Planung geeignet, können jedoch Versuche im zellfreien System und/oder *in vitro* nicht ersetzen (Ding *et al.*, 2004; Mathews *et al.*, 2004).

1.3.3.1.1 *Hammerhead-Ribozym-Spaltung in cis und in trans*

Hammerhead-Ribozyme sind in der Lage, an eine gegenüberliegende Substrat-RNA zu hybridisieren und diese am 3'-Ende des erforderlichen Spalttriplets zu katalysieren. Sind Substrat- und Ribozym-RNA Bestandteil eines identischen RNA-Moleküls, handelt es sich um eine Spaltung *in cis*. Diese Eigenschaft der Selbstspaltung ist den meisten natürlich vorkommenden Ribozymen gemeinsam. Im Gegensatz dazu bezeichnet man die ribozymatische Spaltung von Substrat-RNA, die ein vom Ribozym unabhängiges Molekül darstellt, als Spaltung *in trans*. Die Katalyse *in trans* geschieht fast immer bei der technologischen Anwendung von Ribozymen, da in der Regel die Inhibition unabhängiger Substrat-RNAs beabsichtigt wird. Dennoch kamen *in cis*- und *in trans*-spaltende *Hammerhead*-Ribozyme kombiniert derartig zum Einsatz, das durch Spaltung *in cis* ein benachbartes *in trans*-aktives *Hammerhead*-Ribozym mit definiertem 3'-Ende aus einem RNA-Molekül entstand. Aufgrund dieser Verbindung von Spaltung *in cis* und *in trans* können *Hammerhead*-Ribozyme mit definierten 3'- und 5'-Endsequenzen *in vitro* transkribiert werden, wodurch der Einbau von spezifischen Terminationssignalen in artifiziellen Vektorsystemen verzichtbar ist (Taira *et al.*, 1990). Die folgende Abbildung illustriert die *Hammerhead*-ribozymatische Spaltung *in cis* und *in trans*.

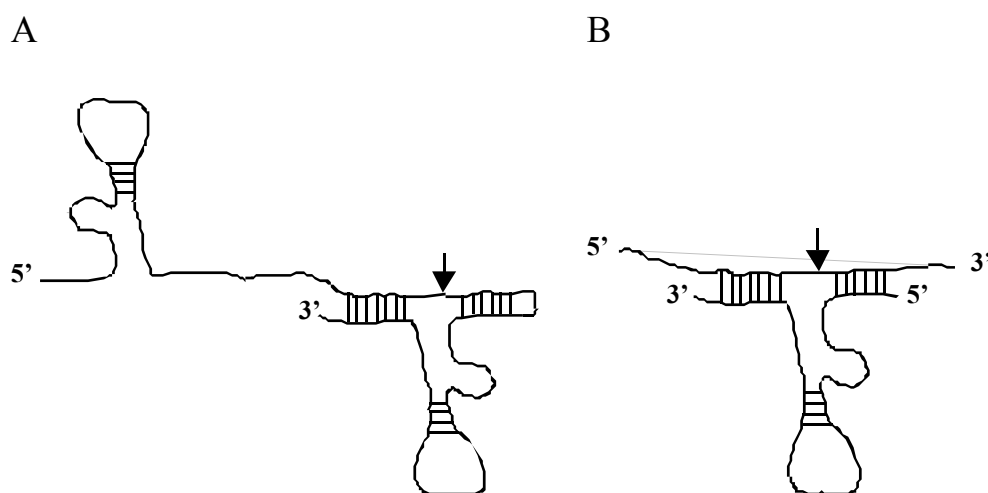


Abbildung 6: Ribozymatische Spaltung *in cis* und *in trans*

Dargestellt sind schematisch die Möglichkeiten der *Hammerhead*-Ribozym-katalysierten Spaltreaktionen. Die Pfeile indizieren die Katalyse.

EINLEITUNG

- A: Ribozymatische Spaltung *in cis*. Ribozym- und Substrat-RNA sind auf einem Molekül lokalisiert.
B: Ribozymatische Spaltung *in trans*. Ribozym- und Substrat-RNA sind auf separaten Molekülen lokalisiert.

1.3.3.2 Kinetische Charakterisierung von Ribozymen

Zur Untersuchung der Effizienz eines einzelnen Ribozymes dienen Reaktionskinetiken. K_{cat} und k_M sind Reaktionskonstanten für alle katalysierten Prozesse, die zum einen die Reaktionsrate (k_{cat}) und zum anderen die Affinität von Enzym/Ribozym zum Substrat (k_M) beschreiben. Häufig verwendet man den Quotienten k_{cat}/k_M , um die katalytische Effizienz des zu untersuchenden Ribozymes auszudrücken. Darüber hinaus stellen auch die beobachteten Spaltrate, k_{obs} , sowie der Initialgeschwindigkeit, v_{ini} , kinetische Eigenschaften des zu untersuchenden Ribozymes dar.

Kinetische Parameter lassen sich entweder unter Substratüberschuß relativ zum Ribozym (*multiple turnover*) oder unter Ribozymüberschuß relativ zum Substrat (*single turnover*) bestimmen. Bei *single turnover*-Bedingungen wird angenommen, daß das gesamte Substrat am Anfang der Reaktion gebunden wird und demzufolge die beobachtete Reaktionsrate (k_{obs}) nicht von der Assoziation bzw. Dissoziation von Ribozym und Substrat abhängt. Diese Bedingungen erlauben die Bestimmung der beobachteten Spaltrate (k_{obs}), welches der Konstante k_2 in Abb. 7 entspricht.

Bei *multiple turnover*-Bedingungen sind mehrere Runden von Assoziation und Dissoziation in die Spaltreaktion involviert, so daß die Reaktionsrate sehr stark von der Stabilität der Helices im Ribozym-Substratkomplex ($R \cdot S$) und in den Ribozym-Produktkomplexen ($P1 \cdot R \cdot P2$) abhängig ist. Es kann beispielsweise dazu kommen, daß bei schwacher Substratbindung die Dissoziationsrate größer ist als die Spaltrate, wobei dann $k_{-1} > k_2$ (Abb. 7), so daß k_{obs} geringer ist als die Spaltrate und keine Produkte gebildet würden.

Im Gegensatz dazu werden bei starker Substratbindung die ersten Substratmoleküle schnell katalysiert, weitere Spaltreaktionen durch die geringe Dissoziationsrate jedoch stark beeinträchtigt. Die beobachtete Spaltrate hängt in diesem Fall am stärksten von den Konstanten k_3 und k_6 (Abb. 7) ab (Übersichten in: Stage-Zimmermann and Uhlenbeck, 1998; Goodchild, 2000).

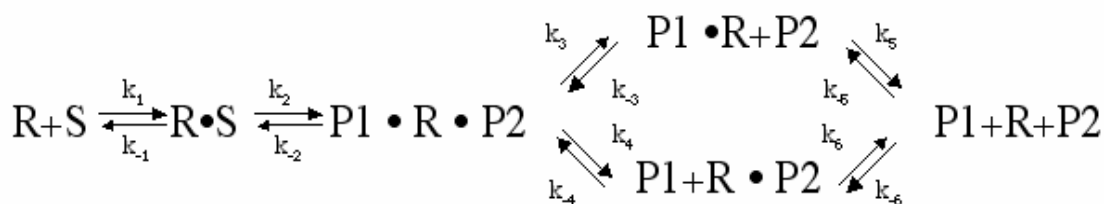


Abbildung 7: Wege der Ribozymreaktion (nach Stage-Zimmermann and Uhlenbeck, 1998)

Dargestellt sind schematisch die möglichen Wege der ribozymatischen Spaltreaktion. R steht für Ribozym, S für Substrat, P1 und P2 sollen die Spaltprodukte der Reaktion symbolisieren. Jede Reaktion und Rückreaktion hat eine spezifische kinetische Konstante (k), die für die Hinreaktionen durchgängig nummeriert wurden ($k_1 - k_6$) und für die Rückreaktionen wurden die Nummerierungen mit einem negativen Vorzeichen besetzt ($k_{-1} - k_{-6}$). Experimentell lassen sich mit Hilfe spezifischer Reaktionsbedingungen einige der Reaktionskonstanten bestimmen.

Durch die Charakterisierung eines *Hammerhead*-Ribozymes im zellfreien System unter *multiple turnover*- sowie *single turnover*-Bedingungen können die Reaktionskonstanten genau bestimmt und daraufhin die kinetischen Eigenschaften eines Ribozymes ermittelt werden.

Obwohl keine direkte Proportionalität zwischen der Effizienz eines Ribozymes im zellfreien System und in Zellkulturen oder *in vivo* besteht, haben sich in der Praxis *Hammerhead*-Ribozyme mit hohen kinetischen Parametern auch oftmals als effektiv bei zellulären Anwendungen erwiesen (Kowalski *et al.*, 2002; Materna *et al.*, 2005).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die ABC-Transporter MDR1, BCRP und MRP2 wurden in unterschiedlichen multidrug-resistenten Zelllinien sowie in Gewebeproben resistenter Tumorzellen als maßgebliche Faktoren für die Ausbildung von Vielfachresistenzen beschrieben. Darüber hinaus sind *Hammerhead*-Ribozyme angewendet worden, die die mRNA-Expression der genannten ABC-Transporter herabregulieren und somit spezifischen zellulären Zytostatikaresistenzen entgegenwirken können. Allerdings stellen die bislang publizierten Arbeiten, die die Modulation der ABC-Transporterexpressionen mit Hilfe von RNA-Technologien zum Ziel hatten, lediglich die Expressionsinhibition eines ABC-Transporters dar. Sowohl Zellkulturdaten als auch klinischen Studien machen jedoch deutlich, daß oftmals die gleichzeitige Expression mehrerer Gene mit dem Auftreten von Multidrug-Resistenz im Zusammenhang steht. Daraus ergibt sich die Problematik, ob es möglich ist, mit Hilfe von RNA-Technologie ein Konstrukt

EINLEITUNG

herzustellen, welches zur gleichzeitigen Inhibition mehrerer unabhängiger Gene befähigt ist.

Aufgrund dieser Fragestellung ist es das Ziel dieser Arbeit, ein auf Ribozym-Technologie basierendes Modul zu entwickeln, welches die Expressionen der drei vorgestellten ABC-Transporter simultan unterdrückt und dadurch befähigt ist, spezifischen Zytostatikaresistenzen in multidrug-resistenten Zelllinien entgegenzuwirken.

Um diese Problematik lösungsorientiert zu bearbeiten, wurden folgende Teilfragen gestellt:

1. Ist es möglich, durch die Anwendung computergestützter RNA-Sekundärstrukturanalyseverfahren ein *Hammerhead*-Ribozym-Konstrukt zu entwickeln, welches gegen die mRNAs der ABC-Transporter MDR1, BCRP und MRP2 gerichtet ist?
2. Ist das entwickelte Konstrukt in der Lage, die genannten Ziel-RNAs im zellfreien System zu spalten?
3. Wie hoch sind die Spaltaktivität und die katalytischen Parameter k_{cat} , k_M , k_{obs} und v_{ini} des Konstruktes im Vergleich zu publizierten Daten?
4. Ist es möglich das Konstrukt in den multidrug-resistenten Zelllinien 257RDB, 257RNOV und A2780RCIS zur Expression zu bringen?
5. Kann durch die Expression des Konstruktes der mRNA-Level sowie der Proteingehalt der genannten ABC-Transporter signifikant reduziert werden?
6. Wie verändert sich das Resistenzniveau der genannten Zelllinien gegenüber den Zytostatika Daunorubicin, Mitoxantron und Cisplatin durch die Expression des Konstruktes?
7. Kann eine Veränderung der spezifischen Zytostatika-Akkumulation von Daunorubicin und Mitoxantron durch die Einbringung des Konstruktes ermittelt werden?

Der Ergebnisteil enthält die Beantwortung der oben genannten Punkte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Sitz, Land
Agarosegelelektrophoresekammer	Biorad, München, D
Beta-Counter Handgerät LB122	Berthold, Berlin, D
Beta-Counter Wallac	Wallac, Freiburg, D
Bechergläser 50, 100, 200, 1000 ml	Schott, Mainz, D
Brutschrank Steri Cult 200	Lifescience, Frankfurt/M., D
Brutschrank für Bakterienkultur	Heraeus, Hanau, D
Durchflußzytometer FACS Calibur 750	Becton-Dickinson, USA
Durchlicht-Mikroskop LSM II	Zeiss, Göttingen, D
Einfrierboxen	Nalgene, USA
Fluoreszenzmikroskop LeicaTCS4D	Leica, Bensheim, D
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München, D
Heizblock Digi Block	Laboratory Devices, Kehl, D
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, CH
Light Cycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Magnetrührer RCT Basic	Ika, Staufen, D
Meßzylinder 100, 250, 1000 ml	Schott, Mainz, D
MiniProtean II Western Blot Apparatur	Bio-Rad, München, D
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
Netzgerät Power Supply 200/2.0	Bio-Rad, München, D
PA-Gelelektrophoresekammer S4S	OWL, Portsmouth, USA
PCR-Gerät Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter 320	Mettler, Gießen, D
Photometer	Bio-Rad, München, D
Pipet Boy	IBS, CH
Pipetten 0,5-10 µl; 10-100 µl, 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenlesegerät Bio Kinetics Reader	BioTek, USA
Scanner CanoScan D1250U2	Canon, Krefeld, D

MATERIAL UND METHODEN

Schüttelthermostat 3032	GFL, Burgwedel, D
Skalpell	Becton-Dickinson, USA
Sterile Werkbank Laminar Air HBB 2472	Heraeus, Hannover, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tiefkühler -20 °C	Liebherr, CH
Tiefkühler -80 °C	Sanyo, J
UV-Transilluminator	MWG, Ebersberg, D
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel, D
Videodokumentationsanlage Digi Gel Print	Sony, Köln, D
Vortexer Vortex Genie2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hannover, D
Zentrifuge Typ 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Ultrazentrifuge Optima LE 80k	Beckmann, München, D
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	HBG, Giessen-Lützellinden, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller, Sitz, Land
Druckerpapier (für Geldokumentation)	Sony, Köln, D
Einfrierröhrchen CellStar	Greinerbioone, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Falconröhrchen (15, 50 ml)	Nunc, Wiesbaden, D
Filterpapier 3 mm	Whatman, Rotenburg/F., D
Haushaltsfolie Toppits	Melitta, Minden, D
Hyperfilm ECL (für Western Blot)	Amersham Biosciences, UK
Klonierungsringe	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, D
Nylonmembran (für Western Blot)	Macherey-Nagel, Düren, D,
Paketklebeband Tesa	Beiersdorf, Hamburg, D
Parafilm	Roth, Karlsruhe, D
Petrischalen (Ø 10, 20 cm)	Nunc, Wiesbaden, D
Pipetten (steril) 2, 5, 10, 25 ml	BD, USA

MATERIAL UND METHODEN

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenfilm Biomax	Kodak, Stuttgart, D
Sterilfilter Rotilabo	Roth, Karlsruhe, D
6-well Platten	Nunc, Wiesbaden, D
24-well Platten	Nunc, Wiesbaden, D
96-well Platten	Nunc, Wiesbaden, D
Zellkulturgefäße (T25, T75 Flaschen)	Nunc, Wiesbaden, D

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad “*pro analysi*” erworben.

Chemikalie, Katalognummer	Hersteller, Sitz, Land
Aceton, 100014	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid/Bisacrylamid, BIAC1902	Qbiogene, USA
Agar, 9002-18-0	ICN, USA
Agarose, 15510-027	Invitrogen, UK
Amidoschwarz, 1.01167	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumazetat, 101116	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumperoxydisulfat (APS), 101201	Merck, Darmstadt, D
Antibody Diluent, Background Reducing	DakoCytomation, DK
Aprotinin, 13718	Serva, Heidelberg, D
Blue/Orange-Gelauftragepuffer	Promega, Mannheim, D
Borsäure, 100165	Merck, Darmstadt, D
BSA, 6367901	Promega, USA
Carbenicillin, 15875	Serva, Heidelberg, D
Chloroform, 7386	J.T. Baker, Griesheim, D
Cisplatin, 15663-27-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Cocktailtablette Complete, 10481500	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Color Markers High Range, C3312	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Coomassie-Blue, 20279	Pierce, Rockfort, IL, USA
Daunorubicin, 1023	Farmitalia, Padua, I
Diethylpyrokarbonat (DEPC), 18835	Serva, Heidelberg, D

MATERIAL UND METHODEN

Dimethylsulfoxid (DMSO), 102391	Merck, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT), 197777	Roche, Mannheim, D
100 bp-DNA-Längenstandard, 15628-050	GibcoBRL, Eggenstein, D
n-Dodecylhydrogensulfat-Natriumsalz (SDS), L-4390	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäure, 6052	J.T. Baker, Griesheim, D
Ethanol, 8006	J.T. Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid, E-1510	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), 324503	Calbiochem, Darmstadt, D
Dulbecco's PBS, H15-001	PAA Laboratories, A
Fetuin, 21346	Serva, Heidelberg, D
Fötale Kälberserum (FKS), 011-06290M	Gibco, Eggenstein, D
Formaldehyd, 7040	J.T. Baker, Griesheim, D
Formamid, 12027	Merck, Darmstadt, D
Foto-Entwicklerlösung, 5224397	Kodak, Stuttgart, D
Foto-Fixierlösung, 5224381	Kodak, Stuttgart, D
Gel Loading Buffer II,	Ambion, Huntingdon, UK
Genetizin-Sulfat (G418), G-5013	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glukose, G-8270	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glutamin, 2503-024	GibcoBRL, Eggenstein, D
Glyzin, 23390	Serva, Heidelberg, D
Glykogen, 901393	Roche, Mannheim, D
Glyzerin, 23176	Serva, Heidelberg, D
Harnstoff, 108487	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt, 0127-17	Difco, Heidelberg, D
N-(2-Hydroxyethyl)piperacin-N'-ethansulfonsäure (HEPES), 1010110	Merck, Darmstadt, D
Insulin, 18135	GibcoBRL, Eggenstein, D
Kaliumchlorid, 4933	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat, 930185	Riedel-de-Haen AG, Seelze-Hannover, D
Kalziumchloriddihydrat, 102382	Merck, Darmstadt, D

MATERIAL UND METHODEN

Kanamycin, 60615-5G	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
L-15-Zellkulturmedium, BE12-700F	BioWhittaker, Taufkirchen, D
LSAB+, HRP	DakoCytomation, DK
2-Mercaptoethanol, 7569402	Promega, USA
Magermilchpulver, 232100	Becton-Dickinson, USA
Magnesiumchloridhexahydrat, M-9272	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumsulfatheptahydrat, 105886	Merck, Darmstadt, D
Mayer's Hematoxylin	DakoCytomation, Daenemark
Mitoxantron, M6545	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumazid, 106404	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid, 106404	Merck, Darmstadt, D
tri-Natriumcitratdihydrat, 106432	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat, 106392	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphatdihydrat, 106580	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxyd, 106498	Merck, Darmstadt, D
NovaRed	Vector Laboratories, UK
OPTIMEM-Zellkulturmedium	GibcoBRL, Eggenstein, D
Phenol, 100206	Merck, Darmstadt, D
Polyethylenglykol MG8000 (PEG), 109727	Merck, Darmstadt, D
Primary Mouse Negative Control	DakoCytomation, Daenemark
2-Propanol, 8067	J.T.Baker, Griesheim, D
Salzsäure, 100317	Merck, Darmstadt, D
Sulforhodamin B (SRB), S-1402	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
N,N,N',N'-Tetramethylenethylen-Diamin (TEMED), T-8133	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X- 100), X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Transferrin, 36756	Serva, Heidelberg, D
Trichloressigsäure, 100807	Merck, Darmstadt, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris/HCl), 108382	Merck, Darmstadt, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base), 108382	Merck, Darmstadt, D

MATERIAL UND METHODEN

Trypsin, L2153	Biochrom, Berlin, D
Trypton, 0123-17	Difco, Heidelberg, D
Tween20, 37470	Serva, Heidelberg, D
Xylencyanol, X-4126	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.4 Radionukleotide

Radionukleotid, Katalognummer	Hersteller, Sitz, Land
[α - ³² P]-UTP, PB 20283	Amersham, Braunschweig, D

2.1.5 Enzyme

Enzym, Katalognummer	Hersteller, Sitz, Land
DNA-Polymerase Ampli <i>Taq</i> Gold, N808-0240	Perkin Elmer, Freiburg, D
SuperscriptII RNaseH ⁻ Reverse Transkriptase, 18064-022	Invitrogen, Karlsruhe, D
Shrimp Alkalische Phosphatase, M8201	Promega, Madison, WI, USA
T4 Polynukleotidkinase, M0201S	NEB, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase, M0202S	NEB, Ipswich, MA, USA

2.1.6 Kits

Kit, Katalognummer	Hersteller, Sitz, Land
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit, 3003230	Roche Diagnostics, Mannheim, D
MAXIsript <i>In vitro Transcriptions Kit</i> , 1308-1326	Ambion, Huntingdon, UK
RNeasy Kit, 74104	Qiagen, Hilden, D
SuperFect Transfection Reagent, 301305	Qiagen, Hilden, D
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, 11904-018	Invitrogen, Karlsruhe, D
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, 34080	Pierce, Rockford, USA
TOPO TA Cloning Kit, K4500-01	Invitrogen, Karlsruhe, D
T7-MEGAscript <i>High Yield Transcription Kit</i> , 1354	Ambion, Huntingdon, UK
Qiagen Plasmid Midi Kit, 12145	Qiagen, Hilden, D
Qiagen Plasmid Mini Kit, 12123	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit, 28104	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit, 28704	Qiagen, Hilden, D

2.1.7 Synthetisierte DNA-Sequenzen

Alle Sequenzen sind in 5'→3' Orientierung angegeben. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg, D synthetisiert. Die Gensynthese für das Multitargetmultiribozym (MTMR) erfolgte bei der Firma Biospring, Frankfurt/M., D.

Bezeichnung	Sequenz
Ald-fw	ATC CTG GCT GCA GAT GAG TC
Ald-rev	GCC CTT GTC TAC CTT GAT GC
BCRP-fw	CTT ACA GTT CTC AGC AGC TCT TCG
BCRP-rev	CGA GGC TGA TGA ATG GAG AAG
BCRPsub-rev	CGA AGA TTT GCC TCC ACC TGT G

MATERIAL UND METHODEN

MDR1-fw	CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC
MDR1-rev	CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG
MDR1sub-rev	AAG AAA CAA CGG TTC GGA AG
MRP2-fw	GGA ACA ATT GTA GAG AAA GGA TC
MRP2-rev	CAC AAA CGC AAG GAT GAT GAA GAA
MRP2sub-rev	CCT CCA GGC AGC ATT TCC AAG TCT
MTMR	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGC TGT GGC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA TAG GCA AAA TGT TGT CTG GAC AAG CAC CTG GAA CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA AAC ATC TGG AGA AAA TGT TGT CTG GAC AAG CAC GTG CTT GTC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA ACA TTT TAA AAT GTT GTC TGG ACA AGC ACG TGC TTG TCC ACT GAT GAG TCC GTG AGG ACG AAA CAA CAT TTT GTG CTT GTC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA ACA TTT T
M13-fw	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13-rev	CAA AAG GGT CAG TGC TG
pIRES2-fw	TAA GCA GAG CTG GTT TAG TGA AC
pIRES2-rev	TTA TTC CAA GCG GCT TCG
T7-BCRPsub-fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCG AGC GCA CGC ATC CTG AG
T7-MDR1sub-fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TCC AGG CTT GCT GTA AT
T7-MRP2sub-fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCT GTC GGC TCT GGG AAA TCC TC

2.1.8 Plasmide

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid, Katalognummer	Resistenzen	Hersteller
pIRES2-EGFP, 6029-1	Kanamycin, Neomycin	BD, Heidelberg, D
pUC19/MTMR	Ampicillin	BiospringAG, Frankfurt/M., D
pCR2.1-TOPO, K4500-01	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.9 Lösungen und Puffer

Alle im folgenden beschriebenen Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in zweifach destilliertem Wasser angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Angegebene pH-Werte beziehen sich auf eine Lösungstemperatur von 20 °C.

Bezeichnung	Bestandteile	Mengenangaben	Hinweise
Amidoschwarzlösung	Amidoschwarz	0,1 % in 45 % Methanol und 10 % Essigsäure	
Blockpuffer	Magermilch	5 % (w/v)	Magermilchpulver in TBST lösen und Puffer bei -20 °C lagern
10 x PBS	NaCl Na ₂ HPO ₄ KCl KH ₂ PO ₄ , pH 6,8	8,0 % (w/v) 1,15 % (w/v) 0,2 % (w/v) 2 % (w/v)	Vor Gebrauch autoklavieren
Polyacrylamid-(PA)-Gel	Harnstoff Acrylamid/Bisacrylamid APS TEMED	7,0 M 8,0 % (v/v) 0,01 % (v/v) 0,005 % (v/v)	Gel in 1 x TBE ansetzen APS und TEMED zuletzt zugeben
Protein-Destainpuffer	Methanol Essigsäure	90 % (v/v) 2 % (v/v)	
Protein-Elutionspuffer	Ethanol EDTA, pH 8,0 NaOH	50 % (v/v) 0,05 mM 25 mM	
5 x Protein-Running-Puffer	Tris-Base Glycin SDS	1,5 % (w/v) 7,2 % (w/v) 0,5 % (w/v)	
Protein-Sammelgel	Tris-HCl, pH 6,8 Acrylamid SDS APS TEMED	125 mM 4 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,01 % (w/v) 0,005 % (w/v)	APS und TEMED zuletzt zugeben.
Protein-Transferpuffer	Tris-Base	25 mM	Puffer immer frisch

MATERIAL UND METHODEN

	Glycin Methanol	150 mM 20% (v/v)	ansetzen und kühlen.
Protein-Trenngel (7,5%)	Tris-HCl, pH 8,8 Acrylamid SDS APS TEMED	375 mM 7,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,01 % (w/v) 0,005 % (v/v)	APS und TEMED zuletzt zugeben.
RIPA-Puffer	Tris-Base EGTA NaCl TritonX-100 Cocktailtablette	50 mM 5 mM 150 mM 1 % (v/v) 1 auf 20 ml	Lagerung bei 4 °C für 4 Wochen.
RNA-Elutionspuffer	Ammoniumazetat EDTA SDS	0,5 M 1 mM 0,2 % (w/v)	Puffer sterilfiltrieren.
RNA-Fällungspuffer	Ethanol Ammoniumazetat Glykogen	94,3 % (v/v) 0,2 M 0,5 % (v/v)	Puffer sterilfiltrieren.
RNA-Prozessierungspuffer	Tris/HCl, pH 7,5 MgCl ₂	40 mM 12 mM	Puffer sterilfiltrieren.
4 x Sample Puffer	Tris-Base DTT SDS	60 mM 100 mM 2 %	
SRB-Lösung	Sulforhodamin B Essigsäure	0,4 % (w/v) 0,1 % (v/v)	
50 x TAE	Tris-Azetat, pH 8,0 Na ₂ EDTA	2,0 M 50 mM	pH-Wert-Einstellung mit 1 M Essigsäure.
10 x TBE	Tris/HCl, pH 8,0 Borsäure Na ₂ EDTA	0,9 M 0,9 M 25 mM	pH-Wert-Einstellung mit 1 M HCl.
TBST-Puffer	Tween20	0,05 % in 1 x TBS	Lagerung bei 4 °C.
TE-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0 Na ₂ EDTA	10 mM 1,0 mM	pH-Wert-Einstellung mit 1 M HCl und autoklavieren.

2.1.10 Medien für die Bakterienkultur

Es wurden Bakterien der Art *E. coli*, Stamm DH5 α (GibcoBRL, Eggenstein, D) verwendet. Die Kultur erfolgte in den nachstehend aufgeführten Medien, die unter sterilen Bedingungen angesetzt und bei 4 °C gelagert wurden.

Bezeichnung	Bestandteile	Mengenangaben
LB-Agar	Agar	1,5 % (w/v)
	Trypton	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl, pH 7,0	170 mM
LB-Medium	Trypton	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl, pH 7,0	170 mM
SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Glukose	20 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	NaCl	10 mM

2.1.11 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Tab. 3 gibt Auskunft über die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten eukaryotischen Zellen. Diese wurden in L-15 Komplettmedium kultiviert, das unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4 °C gelagert wurde.

Tabelle 3: Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Kulturmedium	Literaturverweis
EPG85-257 P	humanes Magenkarzinom	modifiziertes L-15-Medium	Dietel <i>et al.</i> , 1990
EPG85-257 RNOV	humanes Magenkarzinom	modifiziertes L-15-Medium	Dietel <i>et al.</i> , 1990
EPG85-257 RDB	humanes Magenkarzinom	modifiziertes L-15-Medium	Lage <i>et al.</i> , 2000
A2780 P	humanes Ovarialkarzinom	modifiziertes L-15-Medium	Eva <i>et al.</i> , 1982
A2780 RCIS	humanes Ovarialkarzinom	modifiziertes L-15-Medium	Materna <i>et al.</i> , 2005

Das L-15 Medium wurde durch den Zusatz der folgenden Substanzen komplettiert:

Komplettmedium

FKS

10 % (v/v)

Die Zusätze wurden unter

MATERIAL UND METHODEN

NaHCO ₃	0,112 % (w/v)	sterilen Bedingungen in L-15-Zellkulturmedium gegeben.
Glukose	0,1 % (w/v)	
Fetuin	0,0006 % (w/v)	
Gentamycin	0,0005 % (w/v)	
Transferrin	0,00025 % (w/v)	
Glutamin	4,0 mM	
Insulin	80 IE/l	
Aprotinin	10 MIE/l	

Transfizierte Zellen wurden dauerhaft in Selektionsmedium gehalten, welches aus Kompletmedium mit 400 µg/ml G418 bestand. Bei der Transfektion von Zellen kam serumfreies OPTIMEM-Medium zur Anwendung.

2.1.12 Software

Internet-Explorer 4.5	Microsoft, Redmont, CA, USA
<i>mfold</i> 3.0	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna Rensselaer Polytechnical Institute, Rensselaer, NY, USA
<i>Sfold</i> 2.0	http://sfold.wadsworth.org/index.pl Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY, USA
MS Office 2001	Microsoft, Redmont, CA, USA
Prism 3.0a	GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA
NIH Image 1.61	http://rsb.info.nih.gov/nih-image National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Dissertationsvorlage der HU Berlin	http://edoc.hu-berlin.de Humboldt Universität, Berlin, D

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach Birnboim und Doly (1979) unter Verwendung des Qiagen Plasmid Mini- bzw. Midi-Kits. Zu diesem Zweck wurden Flüssigkulturen von einzelnen Kolonien in 5 ml (Miniprep) bzw. 30 ml (Midiprep) angelegt und ü. N. auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Aufarbeitung der Kulturen geschah nach Herstellerangaben. Bei dem verwendeten System schloß sich an die alkalische Lyse der Zellen die Bindung des Plasmids an eine Anionenaustauschsäule an. Die Elution erfolgte mit 30 µl TE-Puffer. Qualität und Quantität der DNA wurden photometrisch bestimmt.

2.2.1.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers bestimmt. Hierzu wurde die UV-Licht-Absorption der Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gemessen. Dieser Absorptionswert läßt sich folgendermaßen in die Konzentration der entsprechenden Lösung umrechnen:

eine $OD_{260} = 1$ entspricht bei

dsDNA-Lösungen	50 µg/ml
RNA-Lösungen	40 µg/ml
Oligonukleotid-Lösungen	33 µg/ml

Zusätzlich wurde der Quotient der Absorptionen von Licht der Wellenlänge 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen und zur Abschätzung der Qualität der jeweiligen Nukleinsäurelösung herangezogen. Für reine Nukleinsäure-Lösungen sollte das Verhältnis der beiden Absorptionswerte zwischen 1,8 und 2,0 bei DNA-Lösungen und 1,6 und 1,8 bei RNA-Lösungen liegen.

2.2.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Agarose (1,5 % (w/v)) wurde in 1 x TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen gekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50-60 °C wurde der Lösung Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml zugesetzt, woraufhin das Gel gegossen wurde. Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben mit 2 µl 6xDNA-Loading Dye versetzt und anschließend für 1-2 h bei 75 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten geschah durch Ausschneiden des entsprechenden Gelstücks und anschließender Behandlung mit dem Qiagen Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988) diente der gezielten *in vitro*-Amplifizierung ausgewählter DNA-Bereiche mit Hilfe synthetischer, die Zielsequenz flankierender Oligonukleotidprimer und der *AmpliTaq* Gold-DNA-Polymerase. Alle PCR-Ansätze sind in der Tab. 4 aufgelistet.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4: PCR-Ansätze

Art der PCR	Komponenten	Konzentration
RT-PCR	<i>AmpliTaq</i> Gold 10 x PCR-Puffer dNTPs 5'-Oligonukleotidprimer 3'-Oligonukleotidprimer Matrix cDNA H ₂ O _{dd}	0,2 U 2,5 µl je 0,5 µM 5 pmol 5 pmol 50-100 ng ad 25 µl
zusätzlich bei pIRES2-Primern:	Betain DMSO	0,05 M 2,5 % (v/v)
PCR mit Plasmid-Matrize	<i>AmpliTaq</i> Gold 10 x PCR-Puffer dNTPs 5'-Oligonukleotidprimer 3'-Oligonukleotidprimer Plasmid-DNA H ₂ O _{dd}	0,2 U 2,5 µl je 0,5 µM 5 pmol 5 pmol 10 ng ad 25 µl

Die Amplifikation erfolgt im Thermal Cycler nach folgendem Programm:

PCR-Schritt	Dauer, Temperatur
thermische Aktivierung der <i>AmpliTaq</i> Gold Polymerase	10 min, 94 °C
DNA-Amplifikation in 36 Zyklen, bestehend aus:	
• Denaturierung der Doppelstrang-DNA	1 min, 94 °C
• Hybridisierung der Primer an komplementäre Stränge	1,5 min, Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur (T _a)
• Elongation der Primer	1,5 min, 72 °C
Extension	10 min, 72 °C
Abkühlung	10 min bis ∞, 4 °C

Die spezifischen Hybridisierungstemperaturen (*annealing temperature*; T_a) der Primer, die Länge der PCR-Produkte und der Zweck der PCR sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Detailangaben für verschiedene PCRs

5'- und 3'-Primer	T _a	PCR-Produkt-Länge	Zweck der PCR
Aldo-fw/rev	58 °C	443 bp	Positivkontrolle nach cDNA-Synthese
T7-BCRPsub-fw/rev	62 °C	361 bp	Herstellung des BCRP-Substrates für die <i>in vitro</i> -Transkription
T7-MRP2sub-fw/rev	62 °C	251 bp	Herstellung des MRP2-Substrates für die <i>in vitro</i> -Transkription
T7-MDR1sub-	55 °C	259 bp	Herstellung des MDR1-Substrates

fw/rev			für die <i>in vitro</i> -Transkription
pIRES2-fw/rev	50 °C	468 bp	Kontrolle der MTMR-Insertion; Expressionskontrolle des pIRES2- Plasmids nach Transfektion
M13-fw(-20)/rev	55 °C	800 bp	Herstellung der MTMR-DNA für die Klonierung

2.2.1.6 Sekundärstrukturanalyse von RNA

Sämtliche RNA-Sequenzen wurden mit den Programmen *mfold 3.0* und *Sfold 2.0* analysiert. Für darauffolgende experimentelle Anwendungen wurde diejenige RNA-Sekundärstruktur ausgewählt, die über die geringste freie Energie ΔG verfügt (Zarrinkar and Williamson, 1994). Mit Hilfe der Detaildarstellungsoptionen beider Programme konnte man die potentiellen Einzelnukleotide (ssNukleotide) in den ausgegebenen RNA-Strukturen lokalisieren. Darüber hinaus markierten entweder eine farbliche Zuordnung (*mfold 3.0*) oder ein Zahlenwert (*Sfold 2.0*) die Wahrscheinlichkeit für die Einzelsträngigkeit eines Nukleotides. Die Anzahl der potentiellen freien Nukleotide in den Hybridisierungsarmen von Ribozymen diente als Kriterium zur Auswahl der geeignetsten Sekundärstruktur.

2.2.1.7 Herstellung der Substrat-DNA-Matrices

Die Substrat-kodierenden DNA-Abschnitte, die die Ribozymschnittstellen sowie einen 5'-T7-Promotor enthalten, wurden mit Hilfe von PCR amplifiziert. Als Matrix in der PCR dienten die cDNAs der Zelllinien, die die entsprechenden ABC-Transporter überexprimieren. Im Einzelnen verwendete man die cDNA der Zelllinie EPG85-257RNOV als Matrix zur Amplifikation des Substrates BCRP_{sub}, die cDNA der Zelllinie EPG85-257RDB als Matrix zur Herstellung des Substrates MDR1_{sub} und die cDNA der Zelllinie A2780RCIS als Matrix für die PCR des Substrates MRP2_{sub}. Der für die *in vitro*-Transkription erforderliche 5'-T7-Promotor konnte in der PCR durch die Verwendung von entsprechend konstruierten 5'-Vorwärtsprimern, die die T7-Promotorsequenz enthielten, amplifiziert werden. Nach Abschluß der Reaktion wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen und mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kits eluiert und aufgearbeitet (s. Kap. 2.2.1.4). Die aufgearbeiteten PCR-Produkte wurden als Matrices für die *in vitro*-Transkription eingesetzt (s.Kap. 2.2.1.9).

2.2.1.8 Herstellung der MTMR-DNA-Matrix

Die MTMR-DNA mitsamt vorgeschalteter T7-Promotor-Sequenz (s. Kap. 1.1.5) wurde chemisch synthetisiert und in den pUC19-Vektor kloniert. Die Herstellung des pUC19/MTMR-Vektors erfolgte von der Firma Biorad (Frankfurt/M., D). Zur Vorbereitung der *in vitro*-Transkription wurde der Vektor mit Hilfe des Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert und anschließend gefällt (siehe Abschnitt 2.2.1.15). Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in RNase-freiem Wasser solubisiert.

2.2.1.9 *In vitro*-Transkription

Aufgrund der integrierten T7-Promotorsequenzen konnten sämtliche doppelsträngige DNA-Matrices mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert werden. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung des MAXIscript *In vitro Transcription* Kits nach Herstellerangaben. Die folgende Auflistung beschreibt den Reaktionsansatz im Detail:

Komponente	Konzentration
Matrizen-DNA	1 µg
NTPs	je 10 mM
T7-Enzym-Mix	2 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
[α - ³² P]UTP (800 Ci/µl)	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert und die Ansätze im Anschluß für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Gel Loading Dye II abgestoppt und der gesamte Reaktionsansatz auf ein 8 %iges PA-Gel aufgetragen.

2.2.1.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) diente der Auftrennung radioaktiv markierter RNAs. Sie erfolgte in einem 8 %igen PA, 7 M Harnstoffgel in 1 x TBE, welches zwischen zwei Glasplatten, die vorher mit Paketklebeband abgedichtet wurden, gegossen wurde und für eine Stunde auspolymerisiert war. Vor Start der Gelelektrophorese wurde die Abdichtung gelöst und das zwischen den Glasplatten befindliche Gel in eine Halterung vertikal eingespannt. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 30 min bei 20 W, anschließend für 4 h bei 40 in 1 x TBE-Laufpuffer.

2.2.1.11 Elution *in vitro*-transkribierter RNA

Nach Abschluß der PA-Gelelektrophorese wurde das Gel in den Glasplatten aus der Halterung genommen und vorsichtig die obere Glasplatte vom Gel gelöst. Das auf der unteren Glasplatte befindliche Gel wurde daraufhin mit Klarsichtfolie luftblasenfrei umhüllt und in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde daraufhin ein Röntgenfilm aufgelegt und die Position des Filmes auf der Klarsichtfolie mit einem Folienschreiber genau markiert. Nach ca. 10 min wurde der Film entwickelt (siehe Kap. 2.2.1.24) und das Autoradiogramm diente nun zur Lokalisierung der radioaktiv markierten RNA-Banden auf dem Gel. Durch Auflage des Autoradiogramms konnten die Banden der *in vitro*-transkribierten RNAs im Gel lokalisiert, mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt werden. Im Reaktionsgefäß wurden die Gelstücke mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von 350 µl PA-RNA-Elutionspuffer wurden die Banden fünfmal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C aufgetaut, um die Gelstruktur zu zerstören und die nachfolgende Elution der RNA zu erleichtern. Anschließend wurden die Ansätze ü.N. zur RNA-Elution bei 37 °C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde das Eluat durch Zentrifugation (30 min, 14000 rpm, 4 °C) von den Gelstücken getrennt und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumazetat, 2,5 Vol Ethanol und 5 µg Glykogen für 3 h bei -70 °C wurde die RNA aus dem Eluat gefällt und anschließend für 1 h bei 14000 rpm und 4 °C durch Zentrifugation pelletiert. Danach wurde das Pellet mit 70 %igem DEPC-Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

2.2.1.12 Quantifizierung radioaktiv markierter RNA

Die Stoffmenge radioaktiv markierter RNA wurde aus der von ihr emittierten und im β-Counter Wallac 1409 (Wallac, Freiburg, D) detektierten radioaktiven Strahlung bestimmt. In die Berechnung ging zunächst die tatsächlich eingesetzte Menge Radioaktivität A ein. Diese ergibt sich aus der gemessenen Aktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung, A_{kal} , und der Zeit der Kalibrierung, t_{kal} , und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ des verwendeten Isotops (^{32}P mit $t_{1/2}=14,3$ d). Es gilt dann:

$$A[\text{counts}] = \frac{A_{kal}[\text{counts}]}{2^{\frac{t_{kal}[\text{d}]}{t_{1/2}[\text{d}]}}}$$

A eingesetzte Aktivität [counts]

MATERIAL UND METHODEN

A_{kal}	eingesetzte Aktivitaet zum Zeitpunkt der Kalibrierung [counts]
t_{kal}	Zeitpunkt der Kalibrierung [d]
$t_{1/2}$	Halbwertszeit des eingesetzten Isotops [d]

In die Berechnung ging außerdem der Faktor W ein, der den Einbau von unmarkiertem UTP an einer beliebigen Position des Moleküls beschreibt. Dieser Faktor wird aus dem Quotienten der Stoffmenge eingesetzten unmarkierten UTPs, n_{UTP} , und der Anzahl von UMPs je Transkriptionsmolekül, N_{UMP} , berechnet:

$$W[\text{nmol}] = \frac{n_{\text{UTP}}[\text{nmol}]}{N_{\text{UMP}}}$$

W	Faktor für zufälligen Einbau von unmarkierten UTPs
n_{UTP}	eingesetztes unmarkiertes UTP [nmol]
N_{UMP}	Anzahl der UMPs im Transkriptionsmolekül

Die Stoffmenge des Transkripts $n_{\text{Transkript}}$ ist das Produkt aus der gemessenen Radioaktivität der Probe A_{Mess} und dem Quotienten W/A :

$$n_{\text{Transkript}}[\text{nmol}] = A_{\text{Mess}}[\text{counts}] \cdot \frac{W[\text{nmol}]}{A[\text{counts}]}$$

$n_{\text{Transkript}}$	Transkriptstoffmenge [nmol]
A_{Mess}	gemessene Radioaktivität [counts]
W	Faktor für zufälligen Einbau unmarkierten UMPs
A	eingesetzte Radioaktivität [counts]

Nach der Berechnung der Stoffmenge des getrockneten RNA-Pellets wurde dieses in RNase-freiem Wasser aufgelöst und eine Konzentration von 0,5 pmol/µl eingestellt.

2.2.1.13 *In vitro*-RNA-Prozessierung

Die ribozymatische Spaltung der RNA wurde *in vitro* in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter RNA-Prozessierungsbedingungen durchgeführt: 40 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 12 mM MgCl₂ bei 37 °C. Die Konzentrationen von Substrat und MTMR wie auch die Inkubationszeiten variierten je nach Versuchsziel und sind in Tab. 6 beschrieben. Bei Beendigung des Versuchs wurden die Ansätze mit 10 µl Gel Loading Dye II versetzt und im PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen bei der RNA-Prozessierung *in vitro*

Untersuchungsziel	C_{MTMR} (nM)	C_{Substrat} (nM)	t (min)
Autokatalyse MTMR	100	-	120
Identifikation	100	100	120

MTMR-Fragmente			
v_{ini} und k_{obs}	125	25	0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30; 60; 120
k_{cat}/k_M und ΔS	0; 20; 40; 80; 120; 200; 300; 400	40	30

Nach Beendigung der PA-Gelelektrophorese wurde das Gel, wie in Kap. 2.2.1.11 beschrieben, aus der Halterung gelöst und nach Überführung in eine Filmkassette konnte in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Abhängig von der Strahlungsintensität des Gels wurde der Film nach 6-48 h manuell entwickelt (siehe Kap. 2.2.1.24). Die derart erstellten Autoradiogramme wurden zur Bestimmung der kinetischen Konstanten eingescannt und mit Hilfe der NIH Image Software densitometrisch ausgewertet (s. Kap. 2.2.1.25).

2.2.1.14 Berechnung der Reaktionsparameter der ribozymatischen Substratspaltung

Aus den zeitabhängigen Reaktionskinetiken konnten durch densitometrische Vermessung der relativen Signalstärken von Substrat-RNA und Spaltprodukt-RNA Produkt-Zeit-Diagramme erstellt werden. Diese Daten bilden die Grundlage zur Berechnung der zeitabhängigen Reaktionsparameter, wie Initialgeschwindigkeit v_{ini} und beobachtete Reaktionsrate k_{obs} .

2.2.1.14.1 Initialgeschwindigkeit und beobachtete Spaltrate

Grundlage der experimentellen Bestimmung von Initialgeschwindigkeit, v_{ini} , und beobachteter Spaltrate, k_{obs} , sind die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 erstellten Autoradiogramme der zeitabhängigen Reaktionskinetiken. Durch densitometrische Vermessung der Banden von Substrat und Spaltprodukten konnte der prozentuale Anteil der Spaltprodukte (P_t) am eingesetzten Substrat ermittelt und in einem Produkt-Zeit-Diagramm dargestellt werden ($P_t=f(t)$ -Diagramm).

Initialgeschwindigkeit

Die Initialgeschwindigkeit, v_{ini} , der ribozymatischen RNA-Spaltung bezeichnet die Umsetzung des RNA-Substrats S in die beiden Spaltprodukte P1 und P2 während der ersten Minuten der Reaktion. Sie wird aus dem Quotienten der Stoffmenge der gebildeten Produkte P1 und P2 zum Zeitpunkt t errechnet:

MATERIAL UND METHODEN

$$v_{ini}[\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}] = \frac{n_{P1+P2}[\text{mol}]}{t[\text{s}]}$$

v_{ini}	Initialgeschwindigkeit [mol/s]
n_{P1+P2}	Stoffmenge der Spaltprodukte zum Zeitpunkt t [mol]
t	Reaktionszeit [s]

Die Initialgeschwindigkeit, v_{ini} , entspricht dem Anstieg im quasi linear verlaufenden Anfangsbereich des Graphen im $P_t=f(t)$ -Diagramm.

Beobachtete Spaltrate k_{obs}

Des weiteren wurde auf der Grundlage der zeitabhängigen Reaktionskinetiken die sogenannte beobachtete Reaktionsrate, k_{obs} , gemäß den Formeln von Heidenreich *et al.*, 1994 sowie Hendry *et al.*, 1995 berechnet. Im Ergebnisteil erfolgt die Zuordnung der ermittelten Werte nach Heidenreich *et al.*, 1994 bzw. Hendry *et al.*, 1995 jeweils in den Fußnoten der Ergebnistabellen.

k_{obs} nach Heidenreich *et al.*, 1994

Für die Berechnung des Reaktionsparameters nach Heidenreich *et al.*, 1994 wurde zunächst der negative natürliche Logarithmus des relativen Anteils des ungeschnittenen Substrates am Gesamtsubstrat (S_u) ermittelt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

$$k_{obs} = \frac{-\ln S_u}{t} [s^{-1}]$$

k_{obs}	beobachtete Spaltrate nach Heidenreich <i>et al.</i> , 1994
$-\ln S_u$	negativer natürlicher Logarithmus des relativen Anteils des ungeschnittenen Substrates am Gesamtsubstrat ($0 \leq S_u \leq 1$)
t	Reaktionszeit [s]

Der Parameter k_{obs} entspricht dem Anstieg der Regressionsgeraden im quasi linearen Anfangsbereich des Graphen im $-\ln S_u$ -Zeit-Diagramm.

k_{obs} nach Hendry *et al.*, 1995

Bei der Berechnung des Parameters k_{obs} nach Hendry *et al.*, 1995 wird im Gegensatz zur vorgenannten Methode lediglich der Anteil des ungespaltenen Substrates am maximal spaltbaren Substrat, S_{max} , verwendet.

$$k_{obs} = \frac{-\ln S_{max}}{t} [s^{-1}]$$

k_{obs}	beobachtete Spaltrate nach Heidenreich <i>et al.</i> , 1994
$-\ln S_{max}$	negativer natürlicher Logarithmus des relativen Anteils des ungeschnittenen Substrates am

MATERIAL UND METHODEN

t maximal spaltbaren Substrat ($0 \leq S_{\max} \leq 1$)
 Reaktionszeit [s]

Diese Berechnung nach Hendry *et al.*, 1995 bezieht die Tatsache ein, daß die ribozymatische Spaltreaktion nicht zum vollständigen Abbau des eingesetzten Substrats führt, sondern eine maximale Produktbildung erreicht wird. In diesem Fall entspricht k_{obs} dem Anstieg der Regressionsgeraden aus dem Anfangsbereich des Graphen im $-\ln S_{\max}$ -Zeit-Diagramm.

2.2.1.14.2 Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M und ΔS

Basis für die Berechnung der Reaktionsparameter 2.Ordnung, die konzentrationsabhängig sind, wie k_{cat}/k_M und den molaren Stoffumsatz ΔS der Reaktion bilden die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 erstellten Autoradiogramme der konzentrationsabhängigen Reaktionskinetiken. Durch densitometrische Vermessung der Banden von Substrat und Spaltprodukten konnte der prozentuale Anteil der Spaltprodukte (P_t) am eingesetzten Substrat in Abhängigkeit von der MTMR-Konzentration ermittelt und in einem Produkt-Konzentrations-Diagramm dargestellt werden ($P_t = f(C_{\text{MTMR}})$ -Diagramm). Mit Hilfe mathematischer Transformationen wurden daraufhin die Parameter k_{cat}/k_M (nach Heidenreich und Eckstein, 1992 sowie Hendry *et al.*, 1995) und ΔS bestimmt. Im Ergebnisteil erfolgt die Zuordnung der ermittelten Werte nach Heidenreich and Eckstein, 1992 bzw. Hendry *et al.*, 1995 jeweils in den Fußnoten der Ergebnistabellen.

k_{cat}/k_M nach Heidenreich and Eckstein, 1992

Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M wurde von Heidenreich and Eckstein, 1992 folgendermaßen definiert:

$$S_u = 1 - P_t = e^{-t \cdot k_{\text{cat}}/k_M \cdot C_{\text{MTMR}}}$$

S_u Anteil des zum Zeitpunkt t ungespaltenen Substrates am Gesamtsubstrat; $0 \leq S_u \leq 1$
 P_t Stoffmenge des gebildeten Produkts zum Zeitpunkt t [mol]
 k_{cat}/k_M Reaktionsparameter nach Heidenreich und Eckstein, 1992
 t Reaktionszeit [s]
 C_{MTMR} MTMR-Konzentration [M]

MATERIAL UND METHODEN

Die Gültigkeit dieser Formel ist allerdings auf einen Bereich beschränkt, in dem bei steigender Ribozymkonzentration auch eine Zunahme der Spaltprodukte zu verzeichnen ist. Der Parameter k_{cat}/k_M kann nach Umstellung der Formel von Heidenreich und Eckstein wie folgt ermittelt werden:

$$\frac{k_{\text{cat}}}{k_M} = \frac{-\ln S_U}{t \cdot c_{\text{MTMR}}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

$-\ln S_U$ negativer natürlicher Logarithmus des Anteils des zum Zeitpunkt t ungespaltenen Substrates am Gesamtsubstrat; $0 \leq S_U \leq 1$

k_{cat}/k_M Reaktionsparameter nach Heidenreich und Eckstein, 1992

t Reaktionszeit [s]

c_{MTMR} MTMR-Konzentration [M]

Der Parameter k_{cat}/k_M nach Heidenreich und Eckstein entspricht dem Anstieg im angenommenen linearen Teil des $-\ln S_t/t$ -Konzentrations-Diagrammes.

k_{cat}/k_M nach Hendry *et al.*, 1995

Eine weitere Berechnungsmöglichkeit nach Hendry *et al.*, 1995 berücksichtigt die Tatsache, daß die Reaktion nicht immer zum vollständigen Abbau des Substrates führt, sondern ein Maximalwert an gespaltenem Substrat (bzw. entstandener Produkte) erreicht wird. Es kann daher ein Anteil des zum Zeitpunkt t ungespaltenen Substrates an maximal spaltbaren Substrat, S_{max} , definiert werden ($0 \leq S_{\text{max}} \leq S_t$):

$$S_{\text{max}} = 1 - P_{\text{max}} = e^{-t \cdot c_{\text{MTMR}} \cdot K_{\text{cat}}/K_M}$$

S_{max} Anteil des zum Zeitpunkt t ungespaltenen Substrats am maximal spaltbaren Substrat

P_{max} Stoffmenge des gebildeten Produktes zum Zeitpunkt t [mol]

K_{cat}/K_M Reaktionsparameter nach Hendry *et al.*, 1995

t Reaktionszeit [s]

c_{MTMR} MTMR-Konzentration [M]

Auch diese Formel ist nur in dem Bereich definiert, in dem bei steigender MTMR-Konzentration auch eine Zunahme der Spaltprodukte zu verzeichnen ist. Für den Parameter k_{cat}/k_M ergibt sich analog der vorangegangenen Formelumstellung folgende Gleichung:

$$\frac{k_{\text{cat}}}{k_M} = \frac{-\ln S_{\text{max}}}{t \cdot c_{\text{MTMR}}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

$-\ln S_{\text{max}}$ negativer natürlicher Logarithmus des Anteils des zum Zeitpunkt t ungespaltenen Substrats am maximal spaltbaren Substrat

k_{cat}/k_M Reaktionsparameter nach Hendry *et al.*, 1995

t Reaktionszeit [s]

c_{MTMR} MTMR-Konzentration [M]

MATERIAL UND METHODEN

Der Parameter k_{cat}/k_M nach Hendry *et al.*, 1995 entspricht dem Anstieg des angenommenen linearen Abschnittes des Graphen im $-\ln S_{max}/t$ -Konzentrations-Diagramm.

Molarer Stoffumsatz

Anhand der Daten aus den Produkt-Konzentrations-Diagrammen konnte untersucht werden, wie sich verschiedene molare Verhältnisse von MTMR-Fragmenten auf den molaren Stoffumsatz ΔS , d.h. die Bildung von Produktmolekülen pro MTMR-Fragment-Molekül, auswirken. Dabei entspricht der molare Stoffumsatz ΔS pro MTMR-Fragment dem Quotienten aus dem relativen Anteil des gebildeten Spaltproduktes (am eingesetzten Substrat) P_t ($0 \leq P_t \leq 1$) multipliziert mit der eingesetzten Stoffmenge des jeweiligen Substrates n_{Sub} und der eingesetzten Stoffmenge des dazugehörigen MTMR-Fragmentes n_{MTMR} .

$$\Delta S = \frac{P_t \cdot n_{Sub}}{n_{MTMR}}$$

P_t	relativer Anteil der gebildeten Produkte am Gesamtsubstrat zum Zeitpunkt t ; $0 \leq P_t \leq 1$
n_{Sub}	Stoffmenge des eingesetzten Substrates [mol]
n_{MTMR}	Stoffmenge des eingesetzten MTMR-Fragmentes [mol]

2.2.1.15 Präzipitation von DNA

Eine DNA-enthaltende Lösung wurde mit 1/10 Vol 3 M Natriumazetat (pH 5) und 2,5 Vol Ethanol versehen. Die DNA wurde bei -20°C für 20 min gefällt und 15 min bei 4°C und 14000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluß wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 20 μl TE-Puffer oder H_2O_{dd} aufgenommen.

2.2.1.16 Klonierung des MTMR

Die im pUC19/MTMR-Vektor integrierte MTMR-Sequenz wurde zunächst mit Hilfe von M13-Primern amplifiziert (s.Kap. 2.2.1.5) und aufgereinigt (gemäß Kap. 2.2.1.3 und 2.2.1.4). Im Anschluß erfolgte eine Phosphorylierung des PCR-Produktes mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase. Der pIRES2/EGFP-Vektor wurde mit dem Enzym *SmaI* linearisiert und mit der Shrimp Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurden sowohl linearisierter Vektor als auch gereinigtes PCR-Produkt getrennt voneinander präzipitiert (siehe Kap. 1.1.1.15). Für die Ligation wurden

MATERIAL UND METHODEN

linearisierter Vektor und PCR-Produkt im Verhältnis 1:5 zusammengegeben und mit Hilfe der T4 DNA Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde daraufhin wieder präzipitiert und in H₂O_{dd} aufgenommen.

2.2.1.17 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA führte Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik an der Humboldt-Universität Berlin durch.

2.2.1.18 RNA-Isolation

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.19 Reverse Transkription

Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA (2 µg) wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen-DNA-Polymerase Superscript II und Hexanukleotid-Zufallsprimern mit Hilfe des *SuperScript First-Strand Synthesis System* in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Proben wurden nach Beendigung der Synthese 1:10 mit H₂O_{dd} verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.20 Quantitative *real-time* RT-PCR

Die Expressionsstärke spezifischer mRNAs wurde mittels quantitativer *real-time* RT-PCR an einem Light Cycler-Gerät ermittelt. Dazu wurde der Light Cycler Fast Start DNA Master CYBR Green I Kit verwendet. Als Matrize diente die 1:10 verdünnte cDNA, die aus den Gesamt-RNAs der zu untersuchenden Zelllinien gewonnen wurde. Der Reaktionsmix enthielt des weiteren genspezifische Primer für die Zielgene *BCRP/ABCG2* (Primer: BCRP-fw/rev), *MDR1/ABCB1* (Primer: MDR1-fw/rev), *MRP2/ABCC2* (Primer: MRP2-fw/rev) und *ALDOLASE* (Primer: Aldo-fw/rev), deren Sequenzen im Kapitel 2.1.7 zu finden sind. Zur Bestimmung der Molekülzahl pro Reaktionsansatz wurde ein im Vorfeld hergestelltes Standardplasmid verwendet, das das Primer-spezifische PCR-Produkt enthielt. Dieses Standardplasmid wurde vermessen und mit Hilfe seiner Nukleotidanzahl konnte die Molekülanzahl des Plasmids pro µl berechnet werden. Im Reaktionsmix wurde das Standardplasmid auf Konzentrationen von $1,2 \times 10^7$; $1,2 \times 10^6$; $1,2 \times 10^5$; $1,2 \times 10^4$; $1,2 \times 10^3$; $1,2 \times 10^2$; $1,2 \times 10^1$; $1,2 \times 10^0$ Moleküle pro Reaktionsansatz eingestellt. Diese Verdünnungsreihe des Standardplasmids wurde vor jeder Quantifizierung hergestellt. Aufgrund der

bekannten Molekülkonzentrationen des Standardplasmids konnte die Quantität an Molekülen der Proben für das jeweilige Gen durch die LightCycler Software errechnet werden. Zur Ermittlung der relativen Genexpressionen der Gene *BCRP*, *MDR1*, und *MRP2* in den jeweiligen Zelllinien, wurde aus denselben cDNA-Proben die Expression des sogenannten “housekeeping”-Genes Aldolase (*ALD*) bestimmt. Alle Genexpressionsanalysen wurden in drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Im Anschluß wurden die Quotienten aus jeder Versuchsreihe der ABC-Transporter-Quantifizierung und jeder Versuchsreihe der Aldolase-Quantifizierung (9 Quotienten) berechnet. Durch die Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung aller Quotienten konnten die relativen Expressionstärken der jeweiligen ABC-Transporter-Gene in den Zelllinien ermittelt werden.

2.2.1.21 Protein-Isolation

Zur Isolation von Gesamtprotein wurden die entsprechenden Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und bis zur 90 %igen Konfluenz wachsen gelassen. Zur Isolation wurde das Medium von den Schalen abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit 250 µl RIPA-Puffer gleichmäßig bedeckt. Die Schalen wurden dann für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zentrifugation für 8 min bei 14000 rpm und 4 °C wurden Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und im Verhältnis 1:3 mit 4 x Sample Puffer versetzt. Daraufhin wurde die Proteinlösung für 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort erneut für 8 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.22 Quantifizierung von Proteinlösungen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde zunächst 1 ml Protein-Elutionspuffer in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Danach wurde dreimal jeweils 1 µl der zu quantifizierenden Proteinlösung auf eine Nylonmembran pipettiert und diese für 2 min mit Amidoschwarzlösung gefärbt. Die gefärbte Membran wurde daraufhin solange mit Protein-Destainlösung entfärbt, bis fast keine Hintergrundschwärzung mehr sichtbar war. Danach trennte man mit einem sterilen Skalpell gleichmäßig große

Membranstücke, auf denen die angefärbten Proteinspots sichtbar waren, heraus. Zur Ermittlung der Hintergrundfärbung bzw. eines Referenzwertes schnitt man zudem ein ähnlich großes Stück ungefärbter Membran aus. Die Membranstücke wurden in die vorbereiteten 2 ml Eppendorf-Gefäße mit Elutionspuffer überführt und diese für 20 min bei RT geschüttelt. Die Extinktion der Proteinlösung wurde im Anschluß im Photometer bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen. Zur Quantifizierung diente eine Eichkurve mit Extinktionswerten bekannter Konzentrationen des Proteins BSA. Mit Hilfe der Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Proben von deren Extinktionswerten abgeleitet werden.

2.2.1.23 Western Blot

Für den Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran wurde zunächst eine Protein-Gelelektrophorese mit Hilfe der Mini Blot II-Anlage durchgeführt. Nach dem korrekten Zusammenbau der einzelnen Bestandteile wurde zuerst das Trenngel gegossen und auspolymerisieren gelassen. Im Anschluß wurde das Sammelgel gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde 5 x Running-Puffer in die Apparatur eingefüllt. Die Proteinlösungen wurden mit 4 x Sample Puffer versetzt, 10 min bei 95 °C erhitzt und danach auf das Gel appliziert. Die Elektrophorese konnte daraufhin bei 70 V für 3-4 h durchgeführt werden. Danach wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur gelöst und in einer "semi-dry"-Blottingapparatur auf eine Nylonmembran luftblasenfrei geschichtet. Sowohl unter die Nylonmembran, als auch über dem Gel wurden jeweils drei Lagen Whatman-Papier im sogenannten "sandwich"-Prinzip angeordnet. Jede einzelne Lage des "sandwich"-Paketes wurde mit Transferpuffer durchtränkt und luftblasenfrei geschichtet. Danach wurde die Blottingapparatur vorsichtig geschlossen und der Proteintransfer für 1 h bei 20 V durchgeführt. Im Anschluß wurde die Blotappatur auseinandergebaut und die Membran vorsichtig aus dem "sandwich"-Paket gelöst. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran für 5 min mit Ponceau-Lösung gefärbt und danach mehrfach mit H₂O_{dd} solange entfärbt, bis klare Proteinbanden sichtbar wurden. Das Gel wurde in einer Coomassie-Blau-Lösung für 10 min gefärbt und ü.N. in einer 10 %igen Essigsäurelösung entfärbt. Sowohl von der angefärbten Membran, als auch vom Gel wurde ein Foto angefertigt. Nach der Kontrollfärbung der Membran wurde diese ü.N. bei 4 °C in Blockpuffer inkubiert. Danach wurden die Membran für 2 x 15 min mit TBST gewaschen und 2 h mit dem Primärantikörper, der

MATERIAL UND METHODEN

zuvor in einer spezifischen Verdünnung in Blockpuffer gelöst wurde, inkubiert. Daraufhin erfolgten Waschschrte von 2 x 15 min und 2 x 5 min mit TBST und die Inkubation mit dem frisch in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper für 1 h. Danach wurde die Membran für 2 x 30 min und 2 x 15 min mit TBST gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das SuperSignal Western Blot Pico Chemoluminescent Substrate nach Herstellerangaben angewandt und im Anschluß ein Chemiluminizenz-sensitiver Film aufgelegt und entwickelt (siehe Kap. 2.2.1.24). Die verwendeten Antikörper und ihre spezifischen Verdünnungen sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Antikörper für Western Blots

Antikörper; Katalognummer	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
mAb to P-Gp (C219); ALX-801-002	1:100 in Blockpuffer	1. AK zur Detektion von MDR1/ABCB1	Alexis, USA
anti BCRP mAb BXP- 21, ALX-801-029	1:200 in Blockpuffer	1. AK zur Detektion von BCRP/ABCG2	Alexis, USA
mouse anti-GAPDH mAb; MAB374	1:1000 in Blockpuffer	1. AK zur Detektion von GAPDH	Chemicon, Temecula,CA, USA
mouse anti-actin mAb; MAB1501R	1:1000 in Blockpuffer	1. AK zur Detektion von Aktin	Chemicon, Temecula,CA, USA
goat anti-mouse IgG, Peroxidase conjugated; 31438	1:10000 in Blockpuffer	2. AK zur Detektion von Maus-IgG	Pierce, Rockford, IL, USA

2.2.1.24 Entwicklung von Filmen

Nach der versuchsabhängigen Expositionszeit eines Filmes wurde dieser in der Dunkelkammer aus der Filmkassette genommen und in der Entwicklerlösung solange geschwenkt, bis Signale sichtbar wurden. Danach wurde der Film in ein Wasserbad überführt und für einige Sekunden darin abgespült. Darauf folgte eine Inkubation in Fixierlösung für mindestens 1 min. Nach diesem Schritt erfolgte eine letzte Inkubation in Wasser für einige Sekunden. Mit Filmklammern wurde der entwickelte Film daraufhin aufgehängt und luftgetrocknet.

2.2.1.25 Dokumentation

Radiographie

Zur Sichtbarmachung von radioaktiv-markierten und PAGE aufgetrennten

MATERIAL UND METHODEN

Nukleinsäuren wurde ein Röntgenfilm auf die mit Klarsichtfolie umhüllten Gele aufgelegt. Die Exposition des Filmes erfolgte bei -80 °C für folgende Expositionszeiten:

Anwendung	Expositionszeit
<i>in vitro</i> -Transkription	15 min
<i>in vitro</i> -Prozessierung	6-48 h

Im Anschluß wurden die Filme manuell entwickelt (siehe Kap. 2.2.1.24).

Densitometrische Auswertung

Aufgrund der Schwärzung des Röntgenfilmes konnten radioaktiv markierte Nukleinsäurebanden detektiert und bei *in vitro*-Prozessierungsversuchen quantitativ vermessen werden. Für die quantitative Analyse wurden die entwickelten Röntgenfilme eingescannt. Die Auswertung des digitalen Bildes erfolgte am Computer unter Verwendung der NIH-Image Software.

Fotographie

Nukleinsäurebanden in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe der Videodokumentationsanlage Digi Gel Print fotografiert.

Angefärbte Proteinbanden in PA-Gelen bzw. auf Nylonmembranen wurden am Leuchttisch in ihrer Sichtbarkeit intensiviert und mit Hilfe der Videodokumentationsanlage Digi Gel Print fotografiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultur von Bakterien

Die Kultur von Bakterien erfolgte in LB-Medium im Schüttelinkubator bzw. auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37 °C. Während der Anzucht von transformierten Bakterien wurde das Antibiotikum, gegen welches das zu transformierende Plasmid ein Resistenzgen enthielt, ins LB-Medium bzw. in den LB-Agar gegeben. Die Konzentrationen des Antibiotikums wurden entsprechend der Versuchsprotokolle für die jeweiligen Vektoren, mit denen die Bakterien transformiert wurden, eingestellt. Zur langfristigen Lagerung wurden Bakterien in LB-Medium mit 30 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Zur Aktivierung der Stammkulturen wurden 10 µl der Glycerinkultur entnommen, in 30 ml LB-Medium gegeben und ü.N. auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C herangezogen.

2.2.2.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von kompetenten *E.coli*-Bakterien erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits. Je Transformationsansatz wurde ein Röhrchen chemokompetenter Bakterien mit 2 µl des Transformationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Im Anschluß wurden 250 µl raumtemperierten SOC-Mediums in das Röhrchen pipettiert und dieses wurde für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator geschüttelt. Danach wurden LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, raumtemperiert und 20 µl der Bakteriensuspension pro Platte ausgestrichen. Die Platten inkubierten ü.N. bei 37 °C im Bakterienbrutschrank. Bei der Transformation der Plasmide pUC/MTMR bzw. pCR2.1-TOPO, die ein Ampicillinresistenzgen enthielten, wurde eine Carbinicillinkonzentration von 50 µg/ml im LB-Medium bzw. LB-Agar eingestellt. Bei der Transformation von pIRES2/EGFP wurde eine Kanamycinkonzentration von 25 µg/ml eingestellt. Am nächsten Tag wurden je Platte sechs Klone gepickt und die enthaltenen Plasmide aufpräpariert (s. Kap. 2.2.1.1).

2.2.3 Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.2.3.1 Kultivierung humaner Zellen

Sämtliche eukaryotische Zellen (s. Tab. 2) wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in den angegebenen Medium kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der spezifischen Resistenzen wurden der Zelllinie EPG85-257RNOV Mitoxantron (200 ng/ml bzw. 0,39 µM), der Zelllinie EPG85-257RDB Daunorubicin

(2,5 µg/ml bzw. 4,2 µM) und der Zelllinie A2780RCIS Cisplatin (10 µg/ml bzw. 33,3 µM) zugesetzt. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen mikroskopisch untersucht (Zelldichte, Infektionen, abgestorbene Zellen), einmal mit PBS gewaschen und das alte Medium durch frisches ersetzt. Sofern ein Kulturgefäß konfluent bewachsen war, wurden die Zellen darin trypsiniert (50 µl Trypsin/cm² Gefäßboden, dann Inkubation bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen). Etwa ein Fünftel der trypsinisierten Zellen wurde in ein neues Zellkulturgefäß mit frischem Medium überführt.

2.2.3.2 Einfrieren von Zellen

Die in T75-Flaschen kultivierten Zellen wurden bei Konfluenz trypsiniert, zentrifugiert (10 min, 800 rpm, RT), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 95 % FKS und 5 % DMSO resuspendiert (ca. 2 x 10⁶ Zellen pro ml). Diese Zellsuspension wurde in Aliquots von 1 ml in Einfrierröhrchen überführt und in mit 2-Propanol gefüllten Einfrierboxen bei -80 °C ü.N. gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen aus den Einfrierboxen in normale Aufbewahrungsboxen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Rekultivierung eingefrorener Zellkulturen wurden die Einfrierröhrchen vorsichtig im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension umgehend in ein Zellkulturgefäß mit Kompletmedium überführt. Am nächsten Tag wurden die aufgetauten Zellen mikroskopisch untersucht, einmal mit PBS gewaschen und neues Medium zugegeben.

2.2.3.3 Transfektion von Zellen

Alle Transfektionen wurden unter Verwendung des SuperFect Transfection Reagent durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden ca. 3 x 10⁵ Zellen in 6-well-

MATERIAL UND METHODEN

Platten ausgesät und in zytostatikafreiem Kompletmedium bis zu einer Konfluenz von 60-70 % anwachsen gelassen. Die Transfektion erfolgte gemäß dem folgenden Protokoll:

1. 2 µg Plasmid-DNA mit 10 mM sterilem Tris-HCl und 65 µl OPTIMEM zu einem Gesamtvolumen von 75 µl mischen;
2. 10 µl SuperFect dazugeben, 5 x auf- und abpipettieren;
3. 10 min bei RT inkubieren;
4. Zellen 1 x mit PBS waschen;
5. 500 µl OPTIMEM zu DNA/SuperFect-Ansatz geben und gut mischen;
6. DNA/SuperFect-Ansatz auf Zellen geben;
7. 2-3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubieren;
8. Medium entfernen, 2 x mit PBS waschen;
9. Kompletmedium auf Zellen geben.

Als Negativkontrolle der Transfektion wurde das Protokoll in einem Parallelansatz ohne die Verwendung von Plasmid-DNA durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die transfizierten Zellen mikroskopisch untersucht und das Kompletmedium durch G418-haltiges Selektionsmedium (Kompletmedium mit 400 µg/ml G418) ersetzt. Die Zellen wurden nach weiteren 24 h trypsinisiert und in eine 20 cm Petrischale überführt. Das Selektionsmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Sobald alle Zellen der Negativkontrolle im Selektionsmedium abgestorben waren und in den Transfektionsplatten einzelne Zellklone makroskopisch sichtbar waren, wurden das Medium entfernt, die Klone mit Klonierungsringsen umschlossen und durch Zugabe von 30 µl Trypsin abgelöst. Die einzelnen, trypsinisierten Zellklone wurden umgehend in 24-well Platten überführt und bis zur Konfluenz in Selektionsmedium gehalten. Danach wurden die Klone entweder in größere Zellkulturgefäße (T75-Flaschen) transferiert oder bis zur weiteren Verwendung eingefroren (siehe Kap.2.2.3.2).

2.2.3.4 Resistenzbestimmung

Die Resistenz aller Zelllinien gegenüber verschiedenen Zytostatika wurde durch ein Zytotoxizitätsexperiment bestimmt (Skehan *et al.*, 1990 bzw. Perez *et al.*, 1993). Hierzu säte man die Zellen in 96-well Platten aus (dreimal 10 Vertiefungen je Versuch), so daß sie ü.N. in Kompletmedium anwachsen konnten. Anschließend wurden Zytostatika verschiedener Konzentrationsstufen (siehe Tab. 7) dazugegeben

MATERIAL UND METHODEN

und für weitere fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit fixierten die Zellen in 10 %iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4 °C, wurden fünfmal mit Wasser gewaschen und die zellulären Proteine für 10 min mit 100 µl SulforhodaminB (SRB) in 1 %iger Essigsäure gefärbt. Überschüssige SRB-Lösung konnte durch 5 x Spülen der 96-well Platten mit 1 %iger Essigsäure entfernt werden. Im Anschluß wurden die Platten ü.N. luftgetrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Protein-SRB-Komplexe in 300 µl 10 mM Tris (pH 8,0) gelöst und für 2 h auf dem Schüttler geschüttelt. Anschließend erfolgte die photometrische Vermessung der gelösten Protein-SRB-Komplexe im Plattenlesegerät (BioTek, USA) bei 562,5 nm. Als Referenzwert wurde eine Vertiefung mit 300 µl 10 mM Tris gefüllt, ebenfalls photometrisch vermessen und der Meßwert durch die Software von den übrigen Werten subtrahiert. Das relative Wachstum der Zellen unter den verschiedenen Zytostatikumskonzentrationen konnte derartig ermittelt werden, indem die Extinktionswerte der Zellen bei einer bestimmten Zytostatikumskonzentration mit denjenigen, die ohne Zytostatikum gewachsen waren (100 %), in Relation gesetzt wurden. Über die Konzentrationen der eingesetzten Zytostatika gibt Tab. 8 Auskunft.

Tabelle 8: Konzentrationen der im Proliferationsversuch eingesetzten Zytostatika

	Mitoxantron [ng/ml]	Daunorubicin[ng/ml]	Cisplatin[μ g/ml]
EPG85-257P	0; 0,63; 2; 3,16; 6,32; 20; 31,6; 63,2; 200; 632	0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 500; 1000; 2500	
EPG85-257RNOV und abgeleitete Transfektanten	0; 6,32; 20; 63,2; 200; 632; 2000; 6320; 10000; 20000		
EPG85-257RDB und abgeleitete Transfektanten		0; 5; 25; 50; 100; 500; 1000; 5000; 10000; 25000	
A2780P			0; 0,0316; 0,1; 0,316; 0,56; 1; 1,78; 3,16; 10; 31,6
A2780RCIS und abgeleitete Transfektanten			0; 0,1; 0,316; 1; 3,16; 5,6; 10; 17,8; 31,6; 100

2.2.3.5 Akkumulation von Zytostatika in Zellen

Die relative zelluläre Akkumulation des Zytostatikums Mitoxantron wurde für die Zelllinien EPG85-257P, EPG85-257RNOV sowie deren abgeleitete Transfektanten und die Akkumulation des Zytostatikums Daunorubicin für die Zelllinien EPG85-257P, EPG85-257RDB sowie deren abgeleitete Transfektanten im Durchflußzytometer bestimmt.

Dabei wurden jeweils 250000 Zellen in vier Vertiefungen einer 6-well Platte ausgesät und in Kompletmedium anwachsen gelassen. Am dritten Tag wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und in jeweils zwei Vertiefungen zytostatikahaltiges Kompletmedium, in die anderen beiden Vertiefungen Kompletmedium ohne Zytostatika gegeben. Das Zytostatikum Mitoxantron setzte man in einer Konzentration von 10 μ g/ml bzw. 19,3 μ M ein, die Konzentration von Daunorubicin war 580 ng/ml bzw. 1 μ M. Die Platte wurde danach für 1 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in ein Falcon-Gefäß übertragen. Es erfolgten zwei Zentrifugationsschritte für jeweils 5 min bei 800 rpm und RT. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit PBS gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation wurde

das Pellet in 500 µl FACS-PBS aufgenommen und in spezielle FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden in einem geschlossenen Behältnis bis zur Messung auf Eis gehalten. Die Messung der intrazellulären Fluoreszenz erfolgte direkt im Anschluß am Durchflußzytometer. Die Zellen wurden mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und die Emission wurde für Mitoxantron bei 630 nm, für Daunorubicin bei 580 nm gemessen. Es wurden pro Probe 2 x 10000 Zellen ausgewertet.

2.2.3.6 Immunzytochemische Lokalisation der ABC-Transporter

Zur Detektion der ABC-Transporter-Proteinexpression in den einzelnen Zelllinien wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät und bis zum Erreichen von 70 %iger Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Objektträger 1 x mit PBS gewaschen, die darauf befindlichen Zellen mit einer Methanol-Azeton-Lösung (1:1) für 10 min bei -20 °C fixiert und im Anschluß luftgetrocknet. Danach wurden die Objektträger für 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um endogene Peroxidase zu blockieren. Die immunzytochemischen Reaktionen wurden im Anschluß für 18 h bei

5 °C mit den folgenden Antikörpern durchgeführt: mouse mAb MRP2clone4-2 für die Detektion von MRP2 (Verdünnung 1:100), mouse mAb C219 für die Detektion von MDR1/P-gp (Verdünnung 1:100) und mouse mAb BXP-21 für die Detektion von BCRP (Verdünnung 1:100). Die Antikörper wurden in Antibody Diluent Background Reducing-Lösung verdünnt. Parallel wurde zu jeder Reaktion eine Negativkontrolle angesetzt, die mit Primary Mouse Negative Control durchgeführt wurde. Die Antigene wurden mit Hilfe biotinylierter Antikörper (15 min bei RT), Streptavidin-Peroxidase-Komplex (15 min bei RT), LSAB+, HRP und NovaRed (10 min bei RT) sichtbar gemacht. Danach erfolgte eine Gegenfärbung und Dehydrierung der Präparate mit Mayer's Hematoxylin die daraufhin im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Multitargetmultiribozymes und Applikation im zellfreien System

In vorhergehenden Arbeiten wurden effektive anti-*MDR1*-, *MRP2*-, und *BCRP*-*Hammerhead*-Ribozyme in unserem Labor entwickelt und sowohl im zellfreien System, als auch in Zellkulturen erfolgreich eingesetzt (Holm *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 2001, 2002, 2004; Materna *et al.*, 2001, 2005). Da diese Gene jedoch in verschiedensten Tumorentitäten auch parallel resistenzassoziiert auftreten, sollte ein sogenanntes Ribozymkonstrukt entwickelt werden, welches die ABC-Transporter mRNA-Expressionen simultan inhibieren kann und somit vielseitig gentherapeutisch einsetzbar wäre. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurden die drei genannten *Hammerhead*-Ribozyme und sogenannte *SPACER*-Abschnitte, die als Sequenzausschnitt der *MDR1*-mRNA gleichzeitig die Zielsequenz für das anti-*MDR1*-Ribozym darstellen, in einem Multitargetmultiribozym (MTMR) dergestalt miteinander kombiniert, daß sich eine tandemartige Anordnung von *in cis*- und *in trans*-spaltenden Ribozymen ergibt. Dabei sollten die *MDR1*-*SPACER* von *in cis*-aktiven anti-*MDR1*-Ribozymen gespalten werden, so daß es zur Freisetzung von MTMR-Fragmenten kommt, die anti-*MDR1*-, anti-*BCRP*- und anti-*MRP2*-Ribozyme enthalten. Diese sollten daraufhin ihre Ziel-mRNAs *in trans* katalysieren können. Die ribozymatische Spaltung *in cis* wird als Autokatalyse, die Spaltung *in trans* als Multitarget-Spaltung bezeichnet (s. Kap. 1.3.1.1). Auf die Konstruktion des Multitargetmultiribozymes wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

3.1.1 Auswahl der MTMR-Sequenz

Die funktionell unterschiedlichen Sequenzabschnitte des MTMR (3 x anti-*MDR1*-Ribozym, 3 x *MDR1*-*SPACER*, 1 x anti-*BCRP*-Ribozym und 1 x anti-*MRP2*-Ribozym) können auf unterschiedliche Art und Weise hintereinander angeordnet werden, so daß sich 21 Variationen eines potentiellen MTMRs ergeben. In Hinblick auf die Sekundärstrukturen der MTMR-Varianten wurden Untersuchungskriterien aufgestellt, die zur Identifizierung der besten Kombination führten:

ERGEBNISSE

1. Ausbildung einer typischen *Hammerhead*-Ribozym-Struktur der integrierten Ribozymsequenzen
2. Hoher prozentualer Anteil an Einzelnukleotiden in den Hybridisierungsarmen der integrierten Ribozyme.
3. Keine sterischen Behinderungen der integrierten Ribozyme durch die Gesamt-MTMR-Sekundärstruktur.

Mit Hilfe der Programme *mfold 3.0* und *Sfold 2.0* konnten die Raumstrukturen aller 21 MTMR-Varianten erstellt und daraufhin die Untersuchungskriterien angewendet werden. Als Resultat dieser *in silico*-Analyse wurde diejenige MTMR-Sequenz identifiziert, die die beschriebenen Kriterien am besten erfüllt und somit die höchste Wahrscheinlichkeit einer Multitarget-Spaltung in sich birgt. In Tab. 9 werden die einzelnen Bestandteile dieser MTMR-Sequenz in der entsprechenden Reihenfolge beschrieben, in Abb. 8 ist das konstruierte MTMR schematisch dargestellt und in Abb. 9 ist die mit Hilfe von *mfold 3.0* ermittelte dazugehörige Sekundärstruktur abgebildet.

Tabelle 9: Funktionelle Domänen des anti-ABC-Transporter-MTMR

Domänen	Funktion der Sequenz
5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG	T7-Promotorsequenz
GGG AAT	Verbindungssequenz
TGC TGT GGC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA TAG GC	anti-MRP2-Ribozym
AAA ATG TTG TCT GGA CAA GCA C	MDR1-SPACER
CTG GAA CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA AAC ATC TGG AG	anti-BCRP-Ribozym
AAA ATG TTG TCT GGA CAA GCA C	MDR1-SPACER
GTG CTT GTC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA ACA TTT T	anti-MDR1-Ribozym
AAA ATG TTG TCT GGA CAA GCA C	MDR1-SPACER
GTG CTT GTC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA ACA TTT T	anti-MDR1-Ribozym
GTG CTT GTC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA ACA TTT T -3'	anti-MDR1-Ribozym

ERGEBNISSE

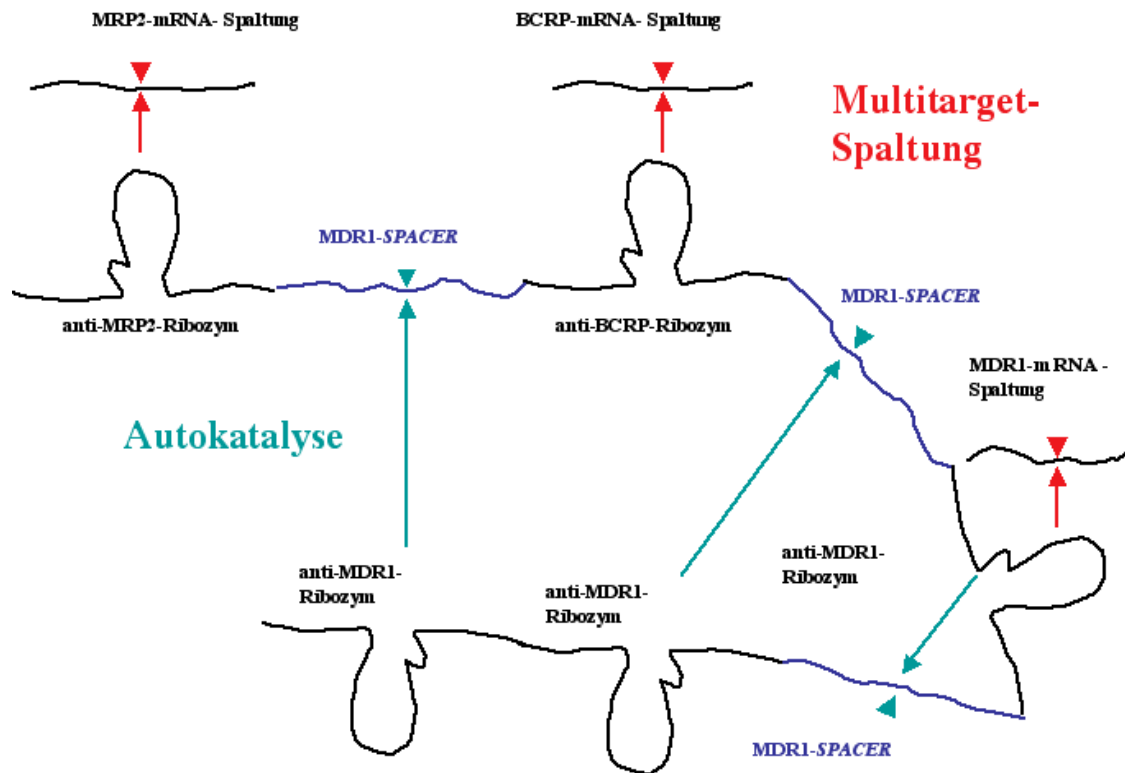


Abbildung 8: Schematische Darstellung des MTMR

Die Abbildung illustriert den Aufbau des MTMR und seine Fähigkeit zur Autokatalyse sowie zur Multitarget-Spaltung (nach Kowalski *et al.*, 2005).

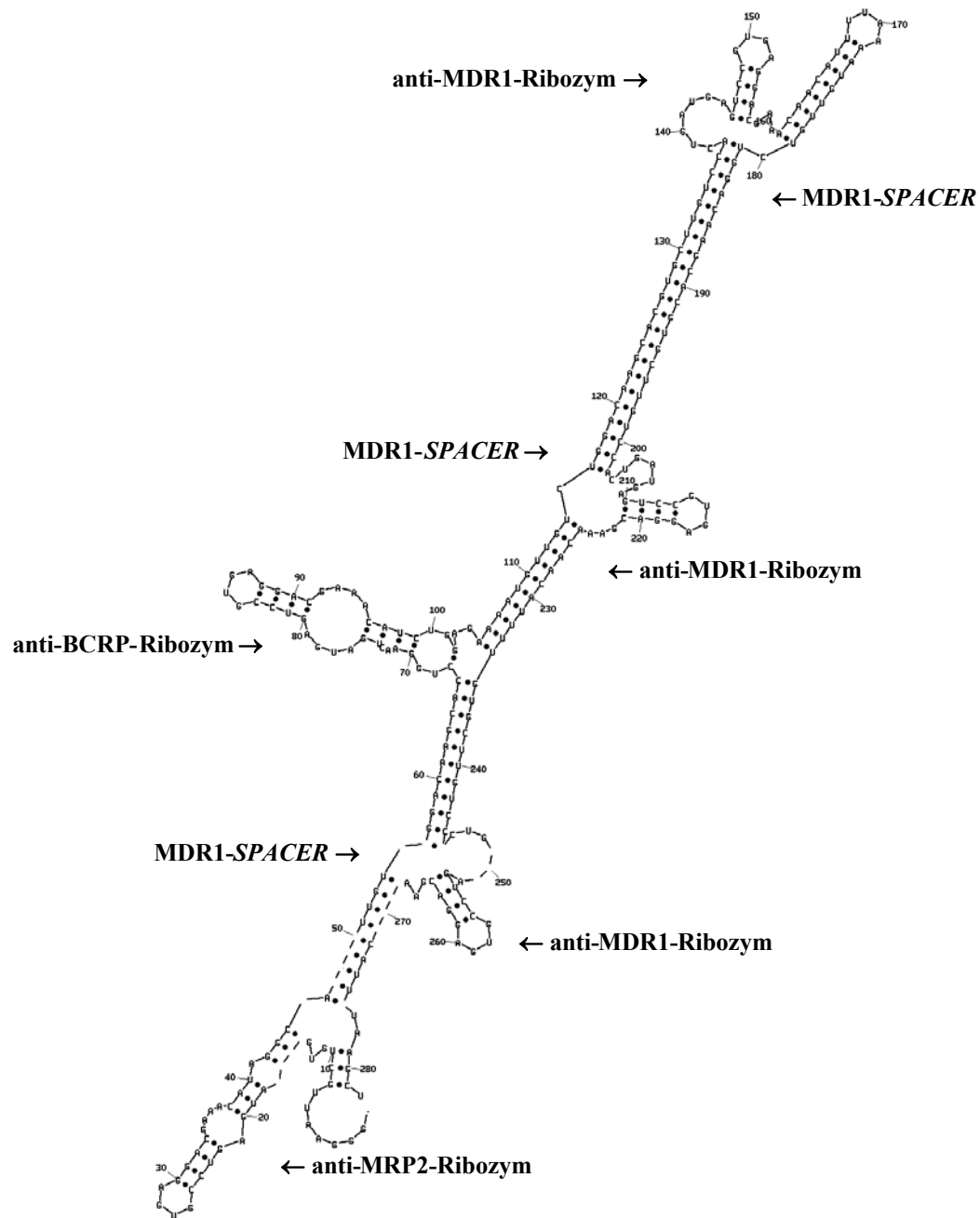


Abbildung 9: Sekundärstruktur des MTMR

Mit Hilfe des Programmes *mfold 3.0* wurde eine RNA-Sekundärstruktur des MTMR erstellt. Abgebildet ist diejenige RNA-Struktur, die die geringste freie Energie aufweist. Die Positionen der funktionell verschiedenen MTMR-Domänen werden durch die Pfeile angedeutet.

Bei der Auswertung der Sekundärstrukturen, die die Programme *mfold 3.0* sowie *Sfold 2.0* berechneten, wurde von den unterschiedlichen Faltungsmöglichkeiten einer Sequenz nur diejenige mit der geringsten freien Energie (ΔG) in die Analyse einbezogen.

3.1.2 Autokatalyse des MTMR

Die ausgewählte MTMR-Sequenz und die Substratsequenzen MDR1sub, BCRPsub und MRP2sub wurden zunächst *in vitro* transkribiert. Die *in vitro*-Transkriptionsprodukte wurden auf ein PA-Gel aufgetragen und autoradiographisch sichtbar gemacht (s. Kap. 2.2.19 und Abb. 10).

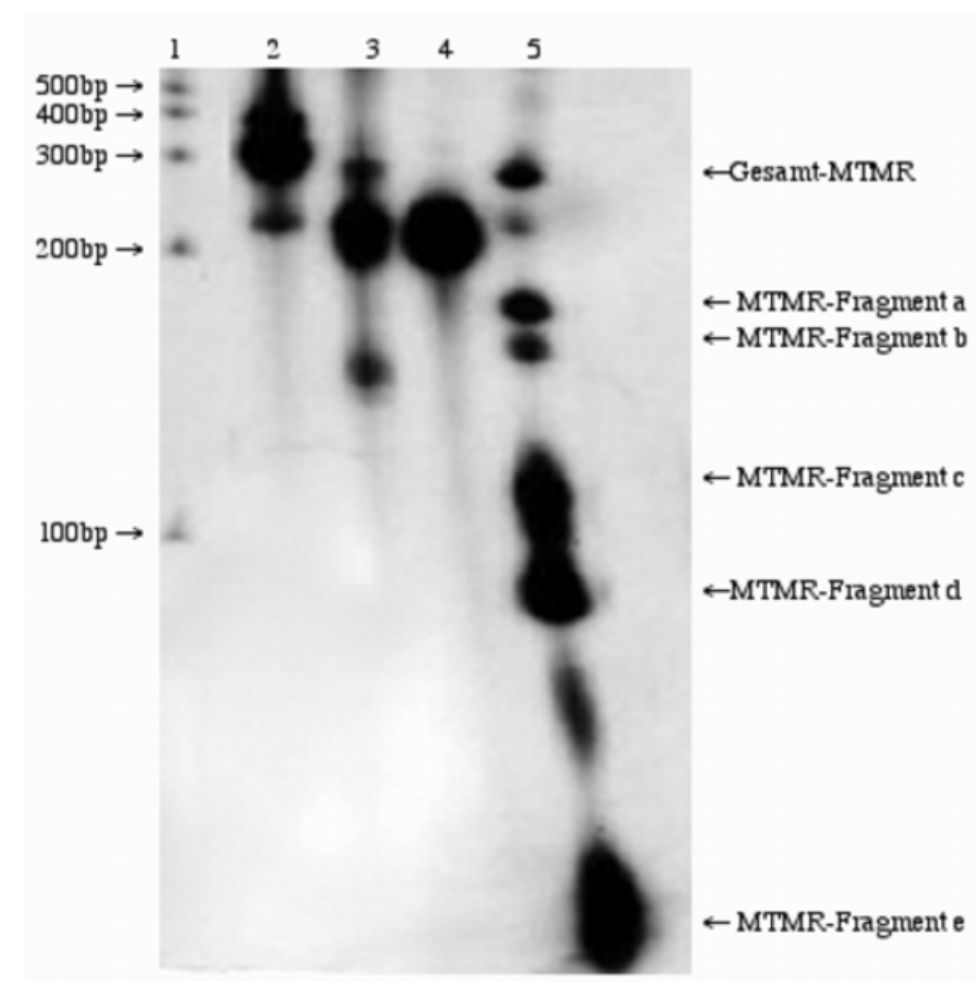


Abbildung 10: *In vitro* Transkription der Substrat-RNAs und des MTMR

Repräsentatives Autoradiogramm der *in vitro*-Transkription des MTMR sowie der Substrate, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.9 durchgeführt wurde. 1: Radioaktiv-markierter RNA-Marker; 2: BCRPsub; 3: MRP2sub; 4: MDR1sub; 5: MTMR (nach Kowalski *et al.*, 2005).

Aus Abb. 10 geht deutlich hervor, daß die *in vitro*-Transkription der MTMR-DNA-Matrize zu mehreren distinkten Transkriptionsprodukten führt. Es wurde daher analysiert, ob diese MTMR-Fragmente a-e aus einer unvollständigen, teilweise abgebrochenen *in vitro*-Transkriptions-Reaktion resultieren oder aufgrund der prognostizierten Autokatalyse des MTMR zustande gekommen sind. Um aufzuklären,

ERGEBNISSE

welche der alternativen Möglichkeiten eingetreten war, wurde die oberste RNA-Bande, die mit Hilfe des RNA-Markers als Gesamt-MTMR identifiziert werden konnte, aus dem PA-Gel eluiert und für 2 Stunden unter Autokatalysebedingungen inkubiert (s. Kap. 2.2.1.13). Auch hier erfolgte eine Auftrennung der Reaktionsprodukte im PA-Gel mit nachfolgender Autoradiographie (Abb. 11):

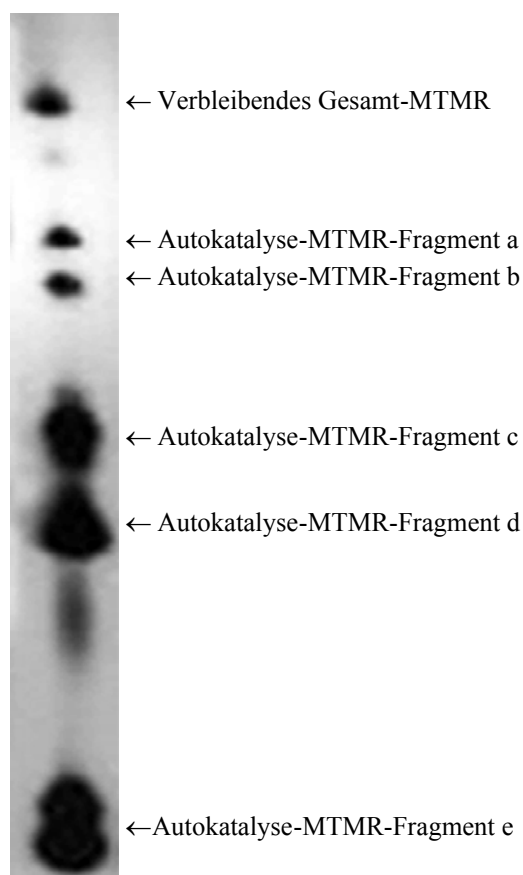


Abbildung 11: Autokatalyse des MTMR

Repräsentatives Autoradiogramm der Autokatalyse des MTMR, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 durchgeführt wurde (verändert nach Kowalski *et al.*, 2005).

Abb. 11 zeigt, daß die MTMR-Banden, die im Eigenschnittversuch entstanden sind, denjenigen, die während der *in vitro*-Transkription des MTMR entstanden sind, gleichen. Es kann daraus geschlußfolgert werden, daß das MTMR zur Spaltung *in cis* in der Lage ist (Autokatalyse) und dabei distinkte Spaltfragmente (MTMR-Fragmente a-e) entstehen. Die Autokatalyse geschieht bereits während der *in vitro*-Transkription des MTMRs. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß mit zunehmender *in vitro*-Transkriptionszeit der Anteil des *in vitro*-Transkriptes, welches das Gesamt-MTMR darstellt, zugunsten der Autokatalyseprodukte geringer wird und nach einer Reaktionszeit von 3 h nicht mehr zu detektieren ist.

3.1.3 Multitargetspaltung der Substrate MDR1_{sub}, BCRP_{sub}, MRP2_{sub}

Die Autokatalyseprodukte des MTMRs (Bezeichnung MTMRa-MTMRe) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zur Katalyse *in trans* oder Multitargetspaltung untersucht. Aufgrund der drei GUC-Spaltripletts der *MDRI-SPACER* kann es durch die ribozymatische Spaltung *in cis* der anti-*MDRI*-Ribozyme zu unterschiedlich großen Spaltprodukten kommen. Es soll in den folgenden Versuchen jedes einzelne Spaltprodukt (a-e) in seiner Zusammensetzung identifiziert werden. Dazu wurden im Vorfeld die potentiellen Autokatalyseprodukte und deren Größe aufgelistet (s. Tab. 10). Mit Hilfe von gezielten Spaltversuchen wurde anschließend experimentell nachgewiesen, welches MTMR-Fragment den theoretischen Vorhersagen in seiner Zusammensetzung entspricht. Dazu wurde unter äquimolaren Verhältnissen jedes einzelne MTMR-Fragment mit jedem der drei Substrate für 2 h bei 37 °C unter RNA-Prozessierungsbedingungen inkubiert (siehe Kap. 2.2.1.13) und im PAGE aufgetrennt. Durch die Detektion von Substrat-spezifischen Spaltprodukten im Autoradiogramm konnte auf die Anwesenheit einer speziellen Ribozymsequenz in dem untersuchten MTMR-Fragment geschlossen werden. In den Abb. 12-14 werden repräsentative Autoradiogramme dieser Schnittversuche gezeigt.

ERGEBNISSE

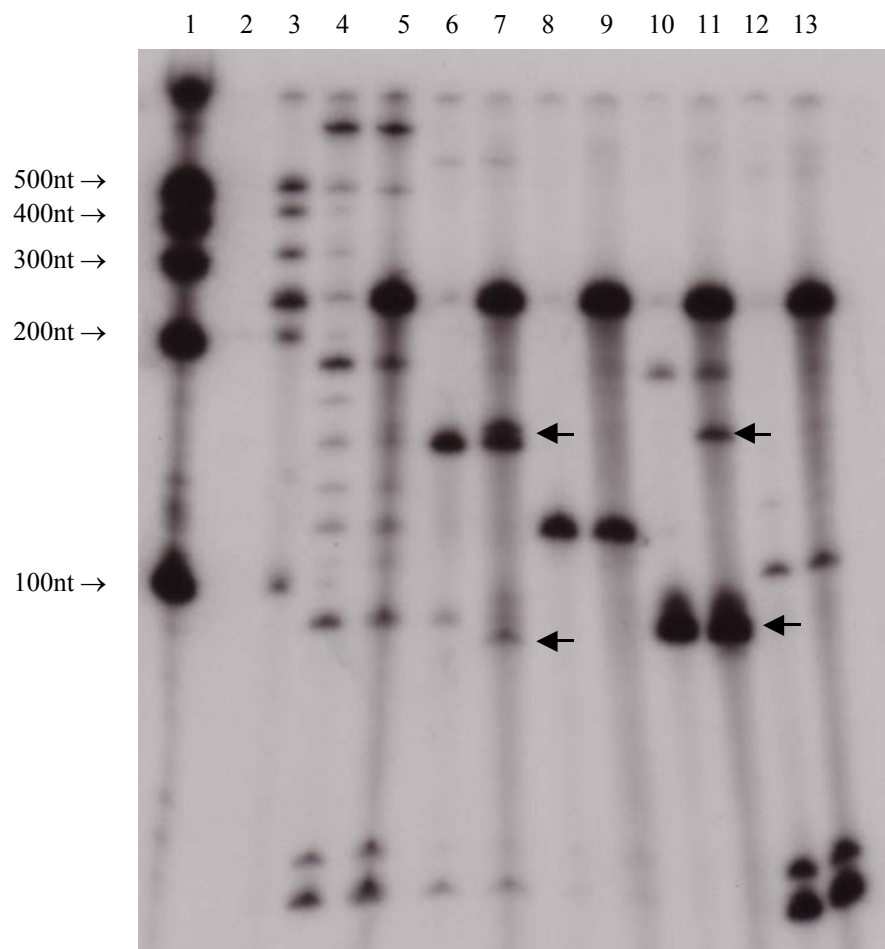


Abbildung 12: Spezifische Spaltung des Substrates MDR1sub durch die MTMR-Fragmente MTMRa-e

Repräsentatives Autoradiogramm der Spaltanalysen von MTMRa-e mit MDR1sub, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 durchgeführt wurden. Die Pfeile kennzeichnen das Auftreten MRP2sub-spezifischer Spaltprodukte der Größe 152 bp und 89 bp. 1: RNA-Marker; 3: MDR1sub; 4: MTMRa; 5: MTMRa + MDR1sub; 6: MTMRb; 7: MTMRb+MDR1sub; 8: MTMRc; 9: MTMRc + MDR1sub; 10: MTMRd; 11: MTMRd + MDR1sub; 12: MTMRc; 13: MTMRc + MDR1sub (verändert nach Kowalski *et al.*, 2005).

ERGEBNISSE

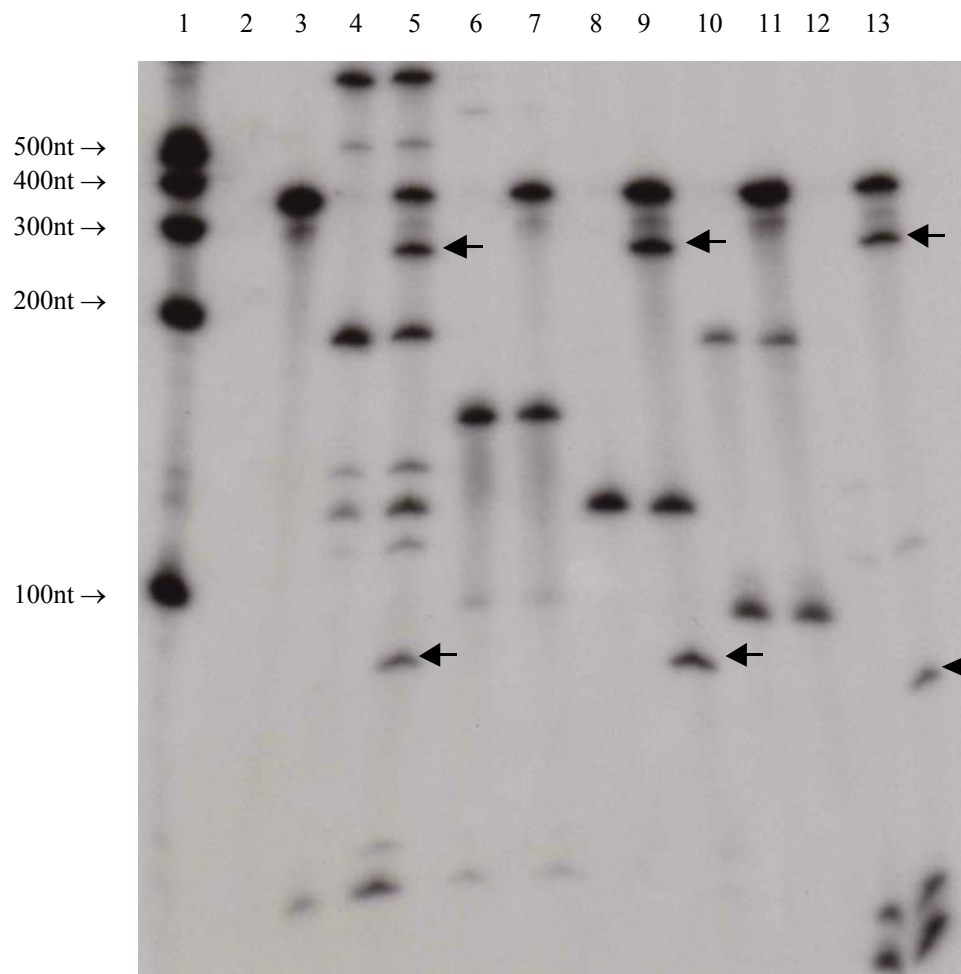


Abbildung 13: Spezifische Spaltung des Substrates BCRPsub durch die MTMR-Fragmente MTMRa-e

Repräsentatives Autoradiogramm der Spaltanalysen von MTMRa-e mit BCRPsub, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 durchgeführt wurden. Die Pfeile kennzeichnen das Auftreten BCRPsub-spezifischer Spaltprodukte der Größe 259 bp und 84 bp. 1: RNA-Marker; 3: BCRPsub; 4: MTMRa; 5: MTMRa + BCRPsub; 6: MTMRb; 7: MTMRb + BCRPsub; 8: MTMRc; 9: MTMRc + BCRPsub; 10: MTMRd; 11: MTMRd + BCRPsub; 12: MTMRc; 13: MTMRc + BCRPsub (nach Kowalski *et al.*, 2005).

ERGEBNISSE

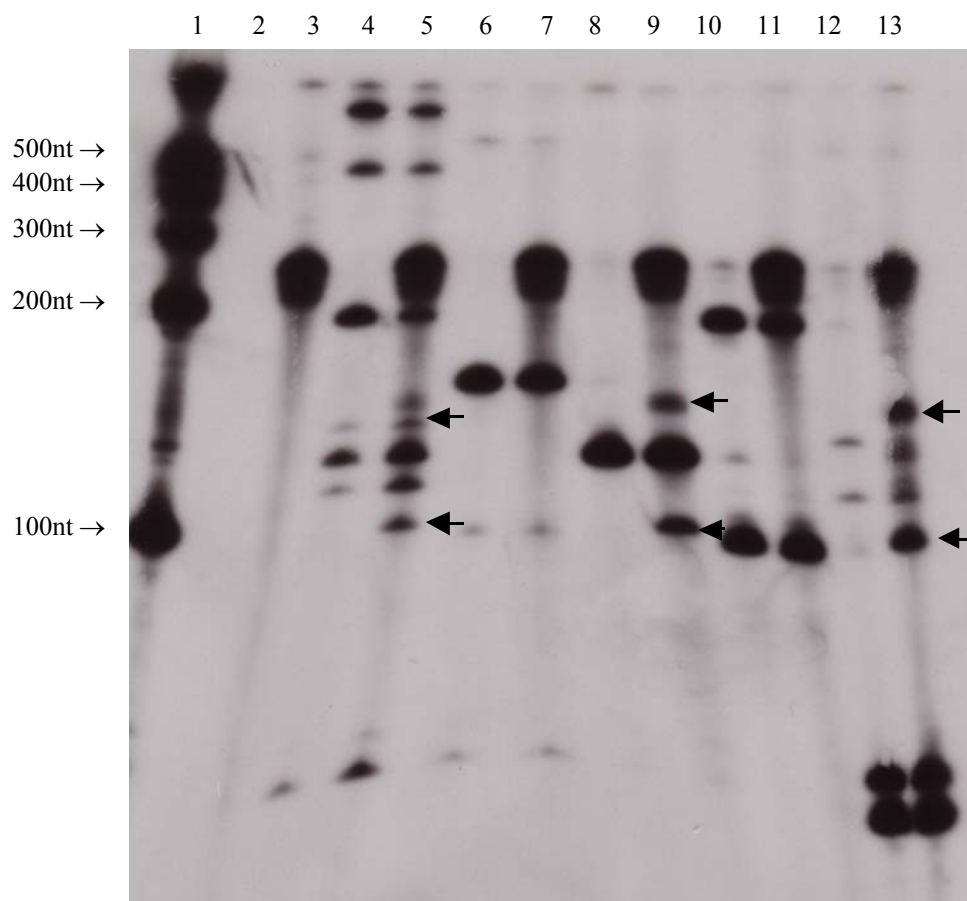


Abbildung 14: Spezifische Spaltung des Substrates MRP2sub durch die MTMR-Fragmente
MTMRa-e

Repräsentatives Autoradiogramm der Spaltanalysen von MTMRa-e mit MRP2sub, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 durchgeführt wurden. Die Pfeile kennzeichnen das Auftreten MRP2sub-spezifischer Spaltprodukte der Größe 134 bp und 99 bp. 1: RNA-Marker; 3: MRP2sub; 4: MTMRa; 5: MTMRa + MRP2sub; 6: MTMRb; 7: MTMRb + MRP2sub; 8: MTMRc; 9: MTMRc + MRP2sub; 10: MTMRd; 11: MTMRd + MRP2sub; 12: MTMRc; 13: MTMRc + MRP2sub (nach Kowalski *et al.*, 2005).

Aufgrund der Detektion spezifischer Spaltprodukte der Substrate MDR1sub, BCRPsub und MRP2sub konnten die MTMR-Fragmente in ihrer Zusammensetzung identifiziert werden. Tab. 10 faßt die Ergebnisse der spezifischen Spaltversuche der Substrate MDR1sub, BCRPsub und MRP2sub durch die Autokatalyseprodukte MTMRa-e zusammen:

Tabelle 10: Identifikation der Autokatalyseprodukte MTMRa-e (Kowalski *et al.*, 2005).

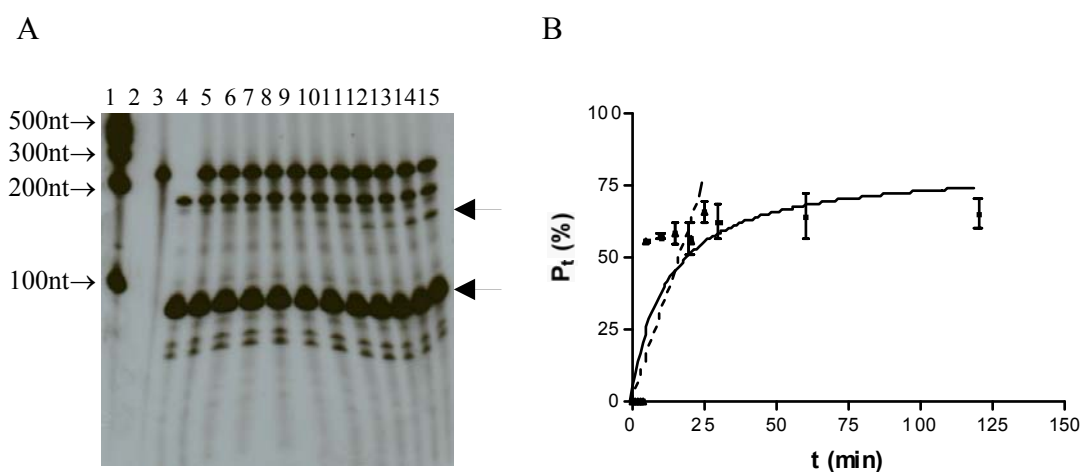
MTMR-Fragment	Größe	Spaltung MDR1 _{sub}	Spaltung BCRP _{sub}	Spaltung MRP2 _{sub}	Zusammensetzung
MTMRa	180 bp	-	+	+	anti-MRP2-Rz ¹⁾ ; MDR1-SPACER; anti-BCRP-Rz; MDR1-SPACER; anti-MDR1-Rz; halbierter MDR1-SPACER
MTMRb	167 bp	+	-	-	halbierter MDR1-SPACER; anti-MDR1-Rz; MDR1-SPACER; anti-MDR1-Rz; anti-MDR1-Rz
MTMRc	115 bp	-	+	+	anti-MRP2-Rz; MDR1-SPACER; anti-BCRP-Rz; halbierter MDR1-SPACER
MTMRd	102 bp	+	-	-	halbierter MDR1-SPACER; anti-MDR1-Rz; anti-MDR1-Rz
MTMR e	60 bp 55 bp	-	+	+	55 bp-MTMR-Fragment: anti-MRP2-Rz ; halbierter MDR1-SPACER 60 bp-MTMR-Fragment: halbierter MDR1-SPACER; anti-BCRP-Rz; halbierter MDR1-SPACER
¹⁾ Rz: Hammerhead-Ribozymsequenz					

3.1.4 Abhängigkeit der MTMR-vermittelten Substratspaltung von der Zeit

Die kinetischen Eigenschaften des MTMR wurden im Folgenden ermittelt, um die Spalteffektivität des MTMRs im zellfreien System mit anderen katalytisch aktiven RNA-Molekülen vergleichen sowie Rückschlüsse auf eine Anwendbarkeit im zellulären Kontext ziehen zu können. Vorerst wurde die Abhängigkeit der ribozymatischen Katalyse *in trans* von der Reaktionszeit analysiert. Dazu wurden Substrat-RNA und MTMR-Fragment-RNA im Verhältnis 1:5 unter RNA-Prozessierungsbedingungen inkubiert (siehe Kap. 2.2.1.13). Die Katalyse des BCRP-Substrates BCRP_{sub} und des MRP2-Substrates MRP2_{sub} erfolgte mit dem MTMR-Fragment MTMR e; das MDR1-Substrat MDR1_{sub} wurde durch das MTMR-

ERGEBNISSE

Fragment MTMRd gespalten. Diese MTMR-Fragmente wurden ausgewählt, da sie die kleinstmöglichen Autokatalyseeinheiten und daher Endprodukte der MTMR-Selbstspaltung darstellen. Die Intensität der Banden der verbleibenden Substrat-RNA sowie der Spaltprodukte wurde durch densitometrische Vermessung quantifiziert. Dadurch war es möglich, die Verhältnisse von entstandenen Spaltprodukten zum verbleibenden Substrat zu ermitteln und in Produkt-Zeit-Diagrammen darzustellen. Aus diesen Diagrammen geht hervor, daß das eingesetzte Substrat nicht vollständig umgesetzt wurde, sondern ein Maximalwert der Substrat-RNA-Spaltung erreicht wird. Während der ersten Minuten der Reaktion ist das Verhältnis von Produktmenge und Zeit dergestalt, daß ein linearer Zusammenhang angenommen werden kann. Danach verringert sich die Menge des Produktes pro Zeiteinheit bis der Maximalwert der Produktbildung erreicht ist. In Abb. 15 (S. 72-73) werden repräsentative Autoradiogramme sowie die dazugehörigen Produkt-Zeit-Diagramme von zeitabhängigen Reaktionskinetiken von MTMR-Fragmenten und der dazugehörigen ABC-Transporter-Substrate gezeigt.



ERGEBNISSE

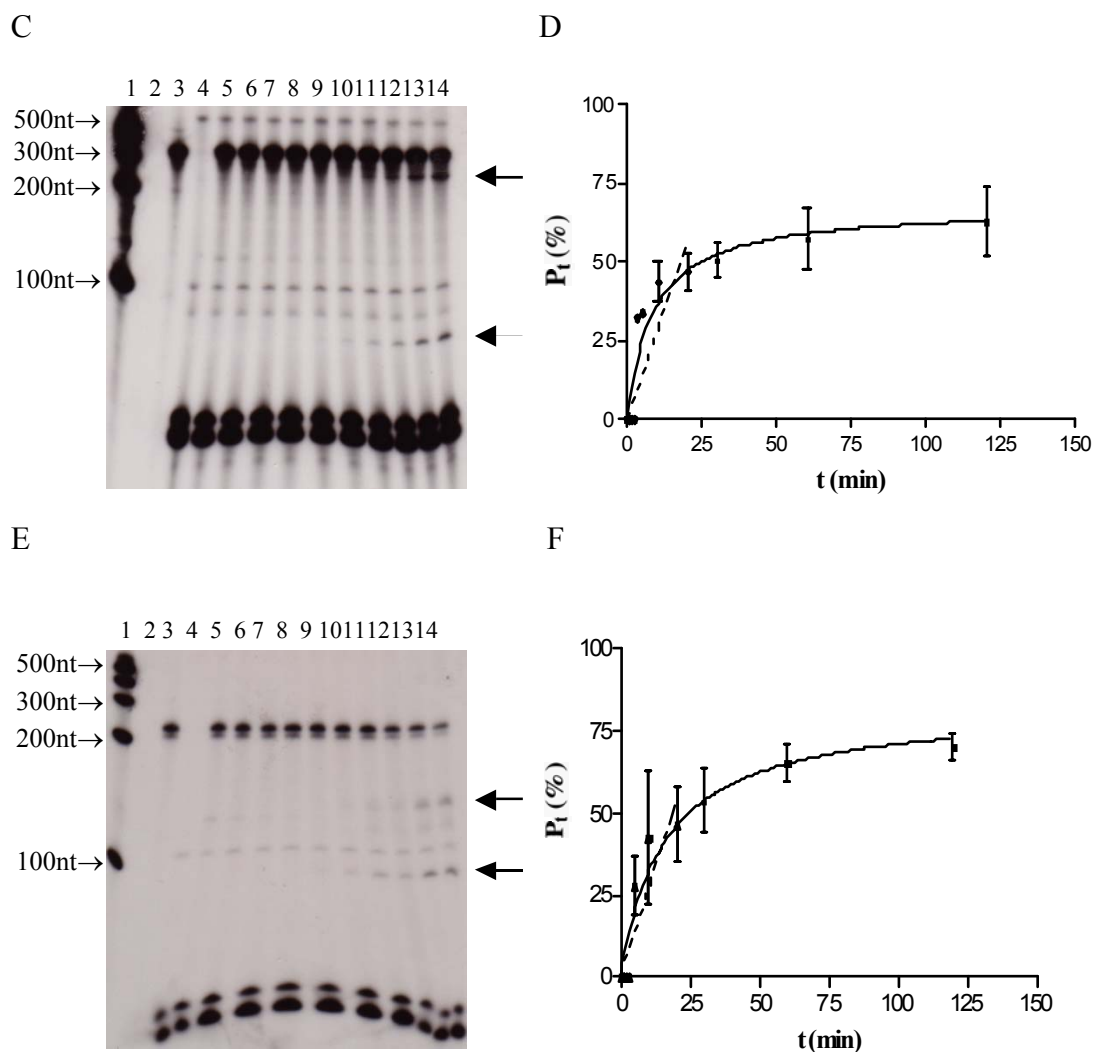


Abbildung 15: MTMR vermittelte Spaltung von der Substrat-RNAs in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Repräsentative Autoradiogramme der Substrat-RNA-Spaltung durch das MTMR und die dazugehörigen Produkt-Zeit-Diagramme, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 und 2.2.1.14 erstellt wurden. Alle graphisch dargestellten Werte sind Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung aus drei Einzelexperimenten.

- A: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik des MTMRd mit MDR1sub. 1: RNA-Marker; 3: MDR1sub; 4: MTMRd; 5: 0 min; 6: 0,5 min; 7: 1 min; 8: 2 min; 9: 3 min; 10: 5 min; 11: 10 min; 12: 20 min; 13: 30 min; 14: 60 min; 15: 120 min.
- B: Produkt-Zeit-Diagramm der MDR1sub-Spaltung durch MTMRd.
- C: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik von MTMRe mit BCRPsub. 1: RNA-Marker; 3: BCRPsub; 4: MTMRe; 5: 0 min; 6: 1 min; 7: 2 min; 8: 3 min; 9: 5 min; 10: 10 min; 11: 20 min; 12: 30 min; 13: 60 min; 14: 120 min.
- D: Produkt-Zeit-Diagramm der BCRPsub-Spaltung durch MTMRe.
- E: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik von MTMRe mit MRP2sub. 1: RNA-Marker; 3: MRP2sub; 4: MTMRe; 5: 0 min; 6: 1 min; 7: 2 min; 8: 3 min; 9: 5 min; 10: 10 min; 11: 20 min; 12: 30 min; 13: 60 min; 14: 120 min.
- F: Produkt-Zeit-Diagramm der MRP2sub-Spaltung durch MTMRe.

3.1.4.1 Initialgeschwindigkeit (v_{ini}) und beobachtete Spaltrate (k_{obs}) der Reaktion

Die Initialgeschwindigkeit der MTMR-vermittelten Substratspaltung entspricht dem Anstieg des Graphen im quasi linearen Anfangsbereich der Produkt-Zeit-Diagramme (s. Abb. 15 B, D, F), d.h. in dem Bereich, in dem die Produktbildung kontinuierlich erfolgt. In den zeitabhängigen Reaktionskinetiken ist dieses bei allen drei Substraten in den ersten Minuten der Reaktion der Fall. Für diesen Bereich wurde eine lineare Regression durchgeführt und gemäß den Angaben in Kap. 2.2.1.14.1 konnte die Initialgeschwindigkeit für die MTMR-vermittelte Spaltung aller RNA-Substrate berechnet werden.

Um alternative Vergleichsmöglichkeiten mit Daten aus der Literatur zu haben, wurde darüber hinaus die beobachtete Spaltrate, k_{obs} , sowohl nach Heidenreich *et al.*, 1994 als auch nach Hendry *et al.*, 1995 ermittelt. Hierzu wurde der negative natürliche Logarithmus des verbleibenden Substrates vom Gesamtsubstrat (S_u ; Heidenreich *et al.*, 1994) bzw. vom maximal spaltbaren Substrat (S_{max} ; Hendry *et al.*, 1995) gegen die Reaktionszeit aufgetragen und gemäß den Angaben in Kap. 2.2.1.14.1 konnte k_{obs} berechnet werden. Die experimentelle Ermittlung von k_{obs} ist in Abb. 16 dargestellt. Die Werte für v_{ini} und k_{obs} sind in Tab. 11 aufgelistet, die Zuordnung zur Methode von Heidenreich *et al.*, 1994 bzw. Hendry *et al.*, 1995 ist in den Fußnoten der Tabelle ersichtlich.

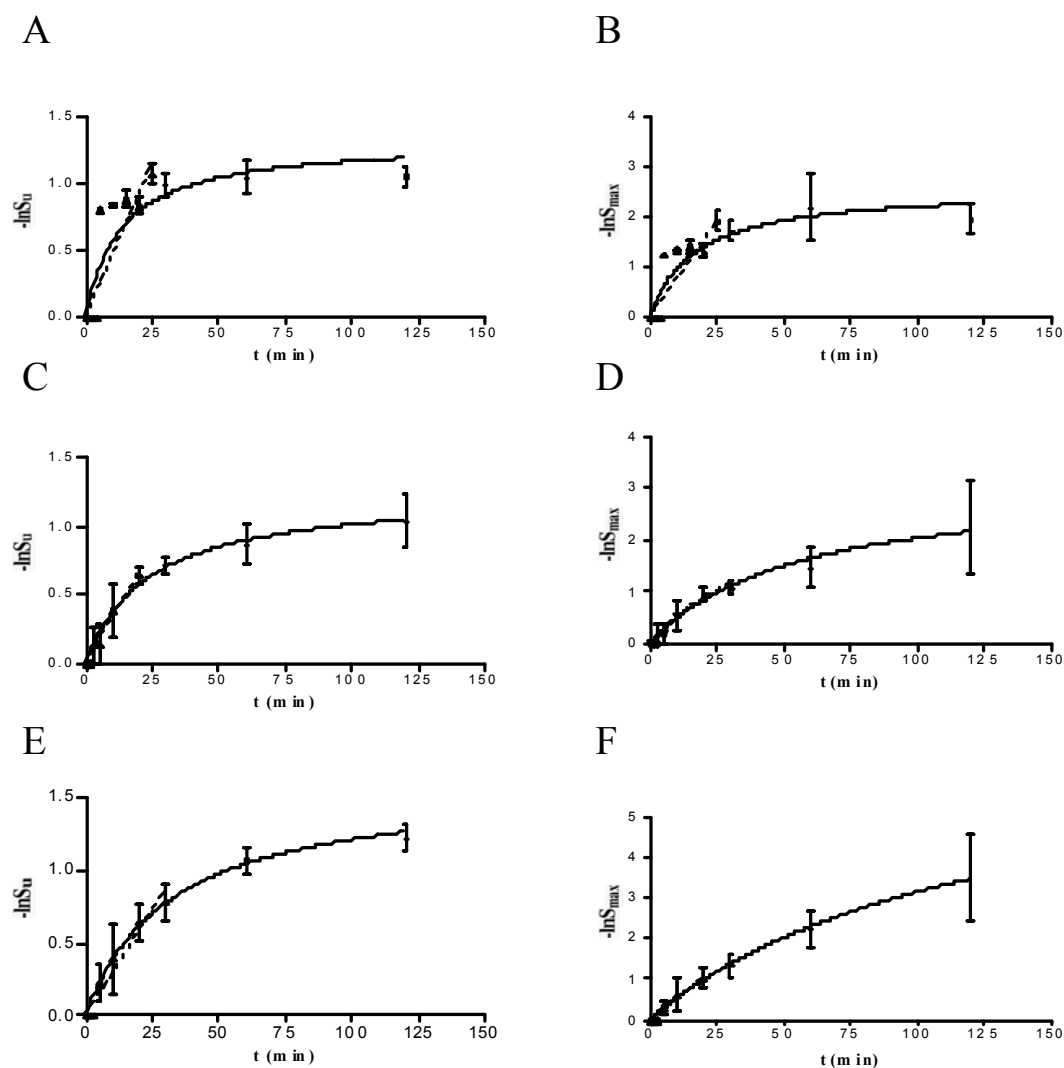


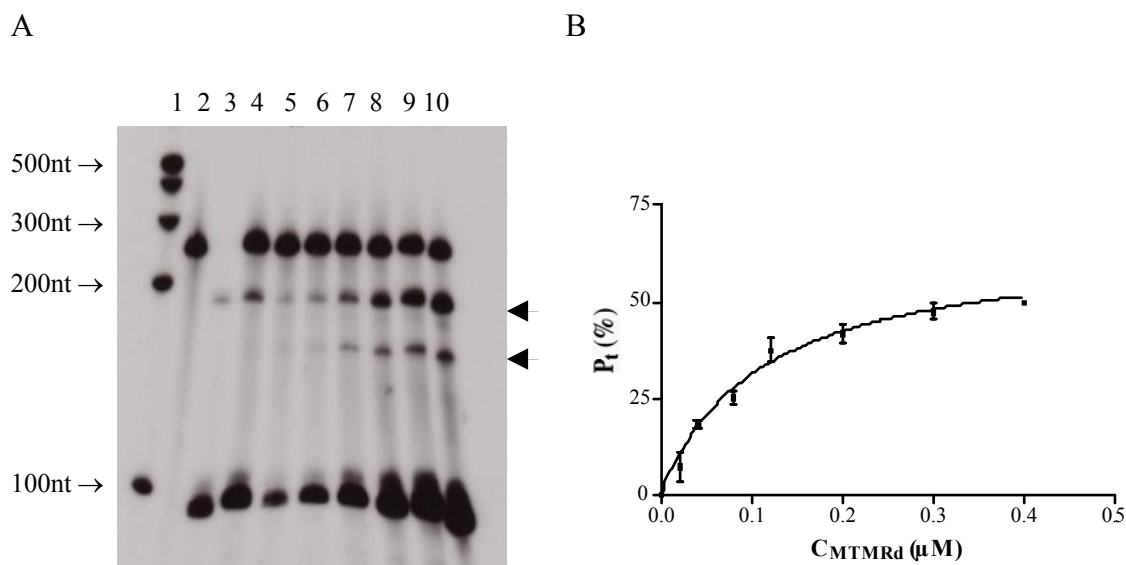
Abbildung 16: Der Reaktionsparameter k_{obs} für die Katalyse der Substrat-RNAs

Aufgrund der densitometrischen Auswertungen der Autoradiogramme der zeitabhängigen Reaktionskinetiken der Substrat-RNAs (s. Abb. 16) wurde gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.14.1 k_{obs} ermittelt.

- A: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von MDR1_{sub} nach Heidenreich *et al.*, 1994.
- B: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von MDR1_{sub} nach Hendry *et al.*, 1995.
- C: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von BCRP_{sub} nach Heidenreich *et al.*, 1994.
- D: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von BCRP_{sub} nach Hendry *et al.*, 1995.
- E: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von MRP2_{sub} nach Heidenreich *et al.*, 1994.
- F: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{obs} für die MTMR-vermittelte Spaltung von MRP2_{sub} nach Hendry *et al.*, 1995.

3.1.5 Abhängigkeit der MTMR-vermittelten Substratspaltung von der MTMR-Konzentration

In einer weiteren kinetischen Charakterisierung wurde die Abhängigkeit der MTMR-vermittelten Katalyse *in trans* von der MTMR-Konzentration analysiert (konzentrationsabhängige Kinetik). Dazu wurden die Substrat-RNAs mit verschiedenen Konzentrationen von MTMR-Fragment-RNAs gemäß den Angaben in Kap. 2.2.1.13 inkubiert. Aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse von MTMR-Fragment zu Substrat konnte die Produktbildung bei *multiple turnover*- (MTMR-Fragment-Unterschuß) und *single turnover*-Bedingungen (MTMR-Fragment-Überschuß) sowie bei äquimolaren Verhältnissen von MTMR-Fragment und Substrat ermittelt werden. In Abb. 17 (S. 76-77) sind repräsentative Autoradiogramme der konzentrationsabhängigen Kinetiken für alle Substrat-RNAs sowie die dazugehörigen Produkt-Konzentrations-Diagramme dargestellt.



ERGEBNISSE

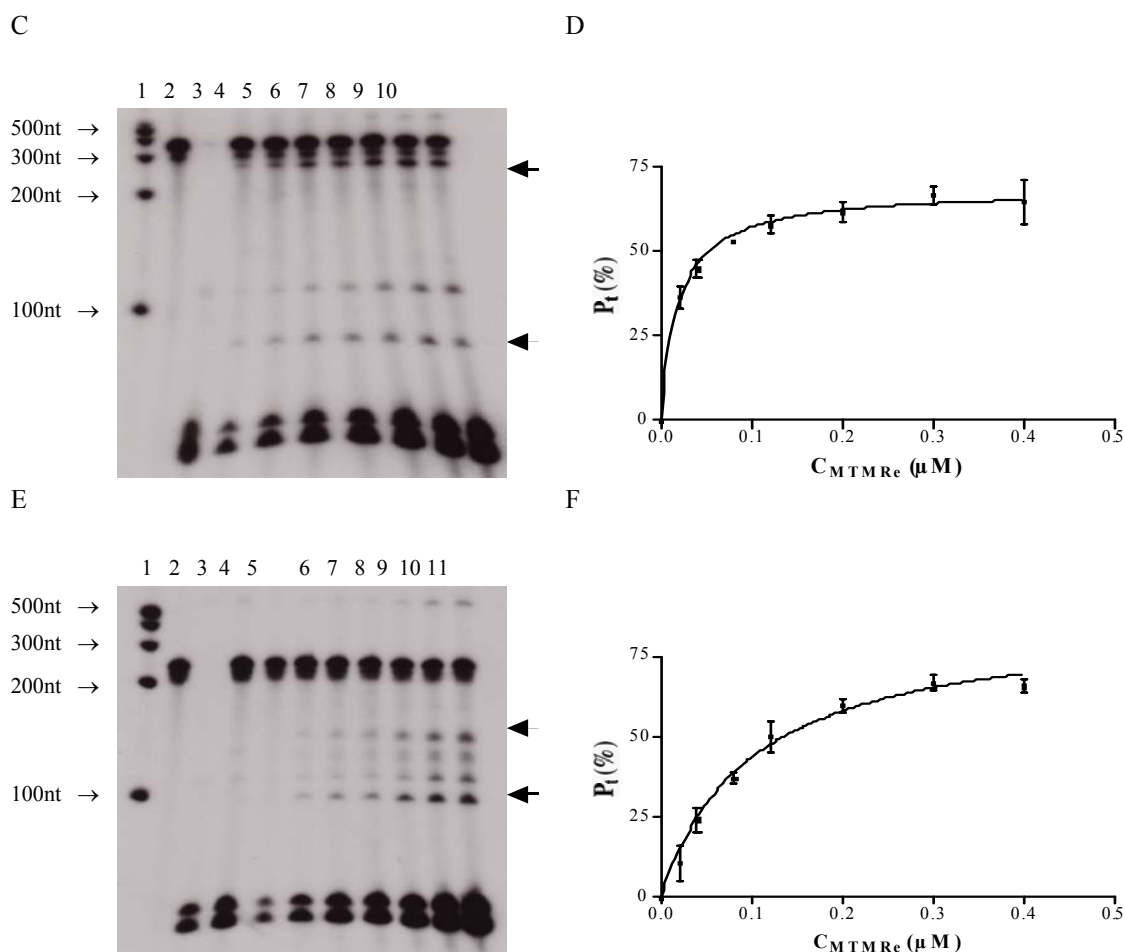


Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Reaktionskinetiken der Katalyse der Substrat-RNAs

Repräsentative Autoradiogramme der Substrat-Spaltung durch das MTMR und die dazugehörigen Produkt-Konzentrations-Diagramme, die gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.13 und 2.2.1.14.2 erstellt wurden. Alle Werte sind Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung aus drei Einzelerperimenten.

- A: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik des MTMRd mit MDR1sub. 1: RNA-Marker; 2: 40 nM MDR1sub-RNA; 3: 120 nM MTMRd-RNA; 4: 40 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub, sofort gestoppt; 5: 20 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub; 6: 40 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub; 7: 80 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub; 8: 120 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub; 9: 200 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub; 10: 300 nM MTMRd + 40 nM MDR1sub.
- B: Produkt-Konzentrations-Diagramm der Katalyse des MDR1sub durch MTMRd.
- C: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik des MTMRe mit BCRPsub. 1: RNA-Marker; 2: 40 nM BCRPsub-RNA; 3: 120 nM MTMRe-RNA; 4: 20 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 5: 40 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 6: 80 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 7: 120 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 8: 200 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 9: 300 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub; 10: 400 nM MTMRe + 40 nM BCRPsub.
- D: Produkt-Konzentrations-Diagramm der Katalyse des BCRPsub durch MTMRe.
- E: Autoradiogramm einer Reaktionskinetik des MTMRe mit MRP2sub. 1: RNA-Marker; 2: 40 nM MRP2sub-RNA; 3: 120 nM MTMRe-RNA; 4: 40 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub, sofort gestoppt; 5: 20 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 6: 40 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 7: 80 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 8: 120 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 9: 200 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 10: 300 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub; 11: 400 nM MTMRe + 40 nM MRP2sub.
- F: Produkt-Konzentrations-Diagramm der Katalyse des MRP2sub durch MTMRe.

ERGEBNISSE

Aus den Produkt-Konzentrations-Diagrammen (Abb. 17 B, D, F) geht hervor, daß bei geringen Konzentrationen des MTMR-Fragments (bis etwa 120 nM) die Produktmenge quasi linear zunimmt. Weitere Erhöhungen der MTMR-Fragment-Konzentrationen haben nicht mehr diesen Einfluß auf die Produktbildung, d.h. die Spaltreaktion nähert sich, analog der zeitabhängigen Reaktionskinetiken, einem Maximalwert der Produktbildung. Das bedeutet, daß unabhängig von der MTMR-Konzentration unter den gewählten Bedingungen vom MDR1-Substrat MDR1sub höchstens 55 % und vom BCRP-Substrat BCRPsub sowie vom MRP2-Substrat MRP2sub maximal 75 % umgesetzt werden können.

Anhand der Daten aus den Produkt-Konzentrations-Diagrammen konnte darüber hinaus untersucht werden, wie sich verschiedene molare Verhältnisse von MTMR-Fragment und Substrat die Bildung von Produktmolekülen pro MTMR-Fragment-Molekül, kurz molarer Stoffumsatz ΔS , auswirken. Gemäß den Angaben in Kap. 2.2.1.14.2 wurde ΔS ermittelt und in Abb. 18 dargestellt.

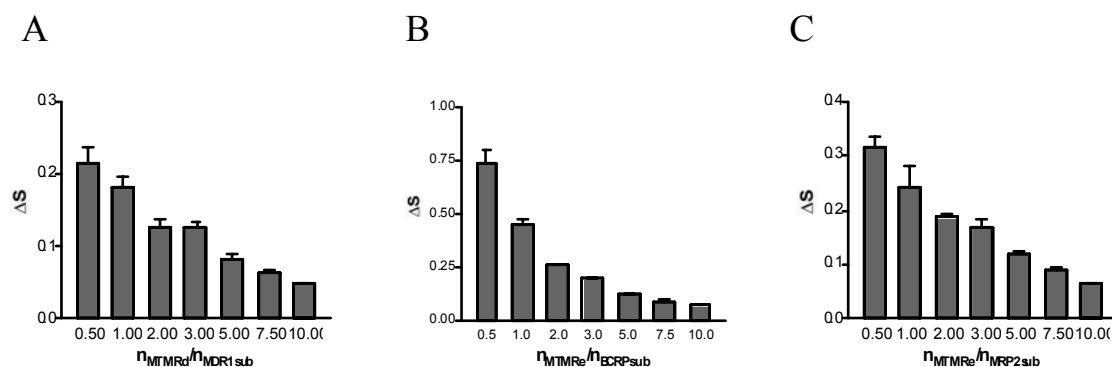


Abbildung 18: Molarer Stoffumsatz der MTMR-vermittelten Substratspaltung

Der molare Stoffumsatz für die Spaltung der RNA-Substrate unter *multiple* und *single turnover* Bedingungen wurde, wie in Kap. 2.2.1.14.2 ausgeführt ist, berechnet. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung aus drei Einzelerperimenten dar.

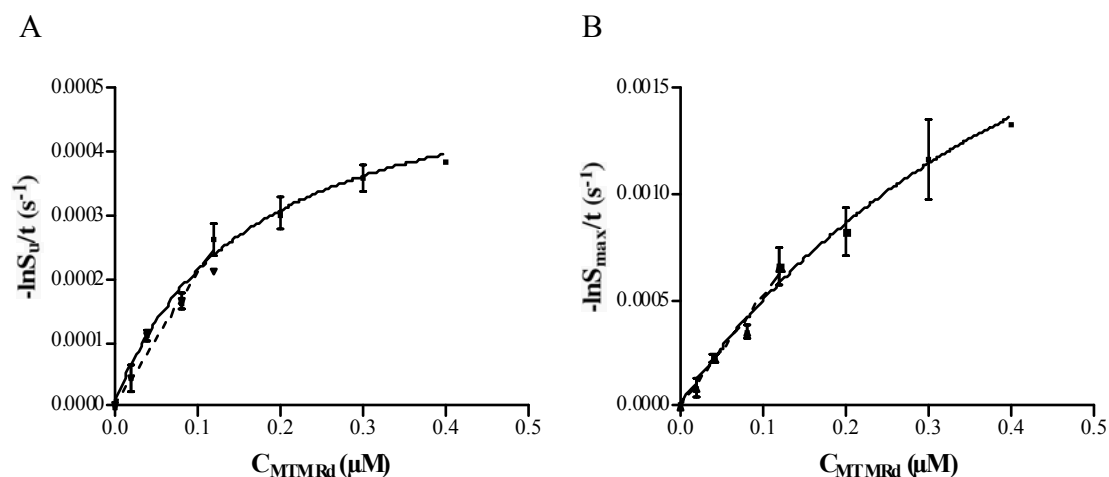
Je geringer der Quotient aus $n_{\text{MTMR}}/n_{\text{Substrat}}$ ist, um so größer wird der molare Stoffumsatz ΔS . Das heißt, daß *multiple turnover* Bedingungen (MTMR-Fragment-Unterschuß) zu einer relativen Steigerung der Spalteffizienz des MTMRs führen.

Legt man die molaren Verhältnisse von Substrat und MTMR-Fragment der zeitabhängigen Reaktionskinetiken zugrunde (Verhältnis jeweils 1:5), entspricht der molare Stoffumsatz einem Wert von 0,84 für die Spaltung von MDR1sub, 0,123 für die Katalyse von BCRPsub und 0,119 für die Umsetzung des MRP2sub. Das bedeutet, daß je Mol eingesetzten MTMR-Fragments 0,084 Mol MDR1sub, 0,123 Mol

BCRPsub und 0,119 Mol MRP2sub umgesetzt wurden. Umgekehrt waren also für die Spaltung von 1 Mol MDR1sub 12 Mol MTMRd, für BCRPsub und MRP2sub jeweils 9 Mol MTMRd erforderlich. Für den maximal erreichten Umsatz von 77 % (19,25 nM) bei MDR1sub und von 75 % (18,75 nM) bei BCRPsub bzw. bei MRP2sub waren bei MDR1sub 231 nM MTMRd, bei BCRPsub 173,25 nM und bei MRP2sub 168,75 nM MTMR-Fragment-RNA erforderlich.

3.1.6 Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M

Auf Grundlage der densitometrischen Auswertung der konzentrationsabhängigen Reaktionskinetiken wurde der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M entsprechend der von Heidenreich and Eckstein (1992) und Hendry *et al.*, 1995 aufgestellten Zusammenhänge experimentell ermittelt (s. Kap. 2.2.1.14.2) und in Abb. 19 (S.79-80) graphisch dargestellt. Die Werte für k_{cat}/k_M finden sich in Tab. 11.



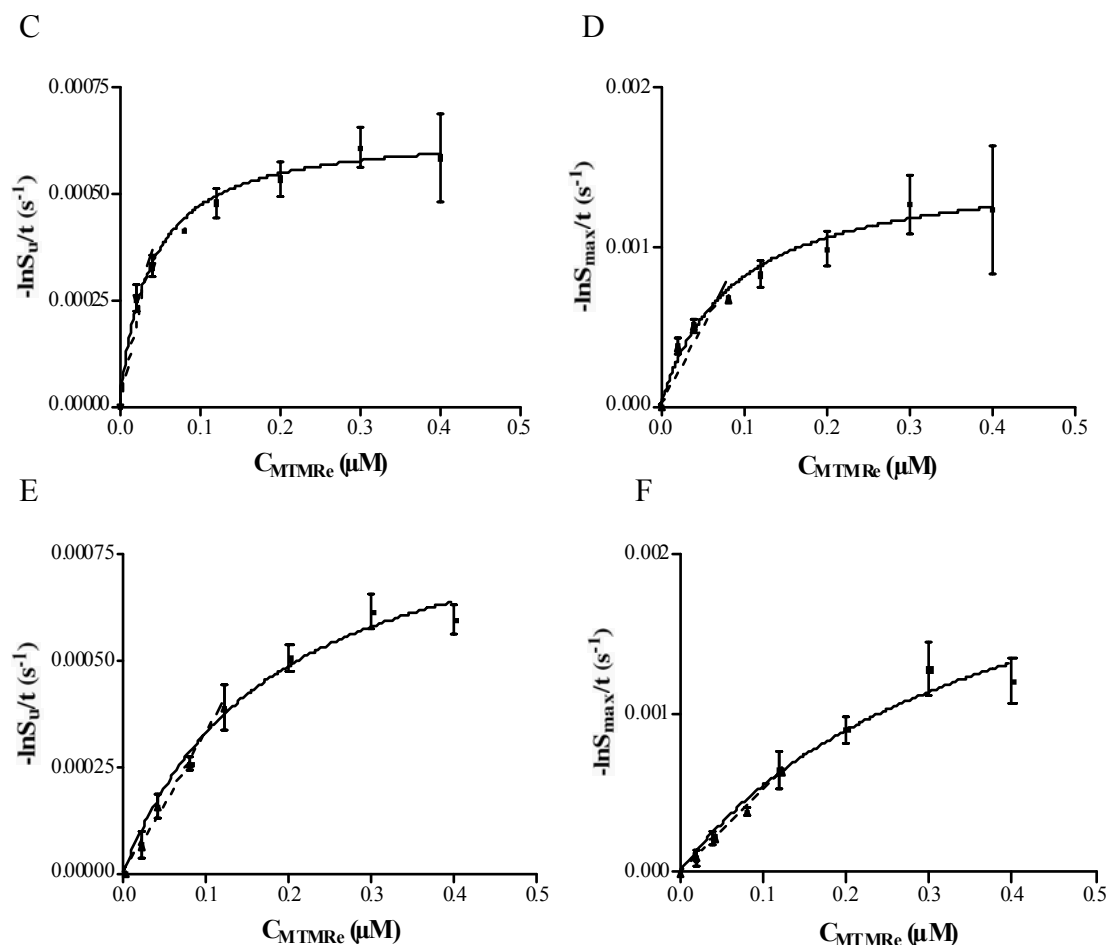


Abbildung 19: Der Reaktionsparameter k_{cat}/k_M für die Katalyse der Substrat-RNAs

Auf Grundlage der densitometrischen Auswertungen der Autoradiogramme der konzentrationsabhängigen Reaktionskinetik der Substrat-RNAs (s. Abb. 17) wurde gemäß der Angaben in Kap. 2.2.1.14.2 k_{cat}/k_M ermittelt.

- A: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von MDR1sub nach Heidenreich und Eckstein, 1992.
- B: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von MDR1sub nach Hendry *et al.*, 1995.
- C: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von BCRPsub nach Heidenreich und Eckstein, 1992.
- D: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von BCRPsub nach Hendry *et al.*, 1995.
- E: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von MRP2sub nach Heidenreich und Eckstein, 1992.
- F: Experimentelle Ermittlung des Reaktionsparameters k_{cat}/k_M für die MTMR-vermittelte Spaltung von MRP2sub nach Hendry *et al.*, 1995.

Die nachfolgende Tab. 11 faßt die ermittelten kinetischen Reaktionsparameter des MTMRs zusammen. Darüber hinaus sind die publizierten kinetischen Daten der im MTMR integrierten Monoribozyme (anti-MDR1-, anti-BCRP-, anti-MRP2-Ribozym) sowie Reaktionskonstanten von ausgewählten Ribozymen, die auf der Grundlage dergleichen Methodik ermittelt wurden, aufgeführt.

Tabelle 11: Kinetische Parameter von MTMR-Fragmenten und Monoribozymen (nach Kowalski *et al.*, 2005)

Ribozym	Substrat-länge (bp)	v_{ini} (fmol s ⁻¹)	k_{cat}/k_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	Referenz
MTMR-BCRP	343	0,11	9744 ^a 9143 ^b	4,1 x 10 ^{-2 a} 3,2 x 10 ^{-2 c}	Kowalski <i>et al.</i> , 2005
BCRP	343	2,21	55000 ^a 24180	2,68 x 10 ^{-2 a} 1,17 x 10 ^{-2 c}	Kowalski <i>et al.</i> , 2001
MTMR-MRP2	233	0,11	5149 ^a 3299 ^b	5,3 x 10 ^{-2 a} 2,9 x 10 ^{-2 c}	Kowalski <i>et al.</i> , 2005
MRP2	233	0,127	9307 ^a 7719 ^b	8,73 x 10 ^{-4 a} 7,66 x 10 ^{-4 c}	Materna <i>et al.</i> , 2001
MTMR-MDR1	241	0,13	5135 ^a 2046 ^b	7,7 x 10 ^{-2 a} 4,6 x 10 ^{-2 c}	Kowalski <i>et al.</i> , 2005
MDR1	259	n.a.	47500 ^{b,d}	n.a.	Holm <i>et al.</i> , 1995
Rz967	234	0,15	10625 ^a 4673 ^b	n.a.	Wichert <i>et al.</i> , 1999
	985	n.a.	22-500 ^b	n.a.	Heidenreich <i>et al.</i> , 1992
n.a.: nicht analysiert					
^a Reaktionsparameter k_{cat}/k_M und k_{obs} nach Hendry <i>et al.</i> , 1995					
^b Reaktionsparameter k_{cat}/k_M nach Heidenreich and Eckstein, 1992					
^c Reaktionsparameter k_{obs} nach Heidenreich <i>et al.</i> , 1994					
^d durchgeführt bei 42 °C					

Ein Vergleich der in Tab. 11 aufgeführten Werte zeigt, daß die katalytische Aktivität des MTMR-Fragmentes, welches die anti-MRP2-Ribozymsequenz enthält (MTMR-MRP2), in dergleichen Größenordnung liegt, wie die des anti-MRP2-Monoribozymes. Für das MTMR-Fragment, welches die anti-BCRP-Ribozymsequenz (MTMR-BCRP) enthält, sind die Werte für v_{ini} und k_{cat}/k_M im Vergleich zum anti-BCRP-Monoribozym etwa um das Zehnfache geringer; wohingegen die Werte des MTMR-BCRP für die beobachteten Spaltrate k_{obs} im Vergleich zum Monoribozym etwas größer sind. Der direkte Vergleich der kinetischen Parameter zwischen MTMR-MDR1 und anti-MDR1-Monoribozym ist unzulässig, da die Monoribozymdaten bei 42 °C ermittelt wurden.

3.2 Anwendung des MTMR in verschiedenen Zellsystemen

3.2.1 Klonierung des MTMR

Die von der Firma Biospring (Frankfurt/M., D) synthetisierte MTMR-Sequenz wurde entsprechend den Angaben in Kapitel 2.2.1.16 “*blunt-end*” in die *SmaI*-Schnittstelle des eukaryotischen Expressionsvektors pIRES2/EGFP kloniert. Die korrekte Insertion der MTMR-Sequenz im Expressionsvektor wurde durch Sequenzierung überprüft. Als Kontrollvektor für die darauf folgenden Transfektionsanalysen wurde der nicht modifizierte pIRES2/EGFP-Vektor verwendet (kurz pIRES2/Kontrolle). In Abb. 20 ist die Vektorkarte von pIRES2/EGFP mit der klonierten MTMR-Sequenz dargestellt.

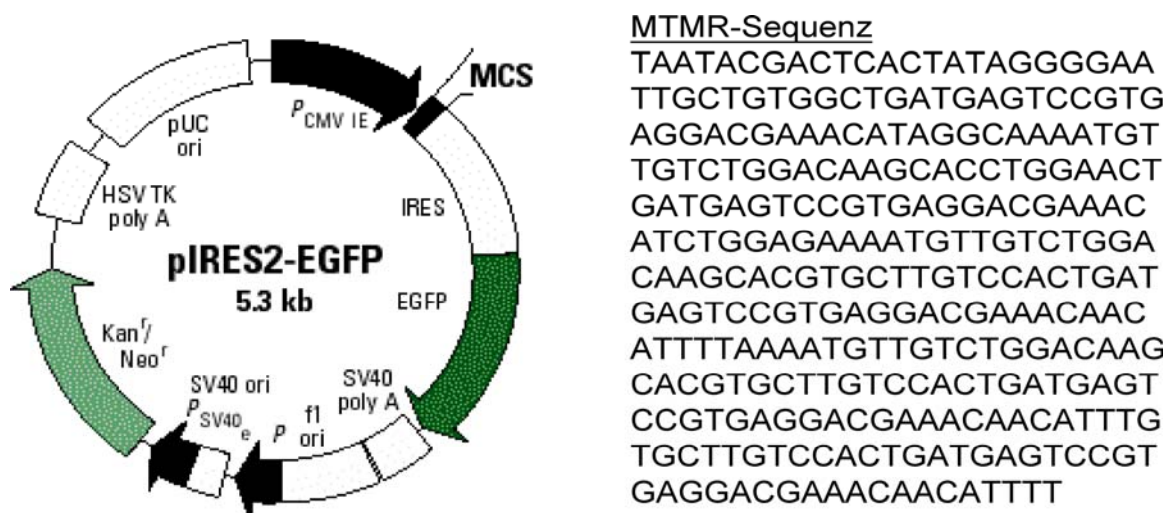


Abbildung 20: Vektorkarte von pIRES2/MTMR (Vektorkarte online unter: www.bd.com)

3.2.2 Expression des MTMR in stabilen Transfektanten

Der MTMR-exprimierende eukaryotische Expressionsvektor pIRES2/MTMR und der Kontrollvektor pIRES2/Kontrolle wurden, wie im Kapitel 2.2.3.3 beschrieben, jeweils in die Zelllinien EPG85-257RDB, EPG85-257RNOV und A2780RCIS stabil transfiziert. Es wurden jeweils 48 MTMR-exprimierenden Transfektanten und 12 Kontrolltransfektanten pro Zelllinie etabliert. Im Folgenden wurde die RNA aller stabilen Klone extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe Kap. 2.2.1.18, 2.2.1.19). Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde eine RT-PCR mit ALD-Primern

ERGEBNISSE

durchgeführt, welche spezifisch mit einem Sequenzabschnitt des konstitutiv exprimierten "housekeeping" Gens *ALD* hybridisieren und ein PCR-Produkt von 249 bp amplifizieren. Die Kontrolle der MTMR- bzw. pIRES2/Kontrolle-Expression in den transfizierten Zelllinien wurde mit Hilfe einer RT-PCR unter Verwendung vektorspezifischer pIRES2-Primer durchgeführt. Hierbei konnte ein PCR-Produkt von 468 bp in den mit pIRES2/MTMR und ein PCR-Produkt von 161 bp in den mit pIRES2/Kontrolle transfizierten Zelllinien detektiert werden. Aus den untransfizierten resistenten Ausgangszelllinien und ihren chemosensiblen Partnerzelllinien wurde wie erwartet kein PCR-Produkt amplifiziert. In Abb. 21 sind die Ergebnisse der RT-PCRs mit Hilfe der Aldolase-Primer sowie der pIRES2-Primer abgebildet. Dabei wurden von transfizierten Zellen jeweils eine Kontroll- und eine MTMR-exprimierende Transfektante pro untersuchter Ausgangszelllinie (257RDB, 257RNOV, A2780RCIS) dargestellt, die auch in den anschließenden Analysen untersucht wurden.

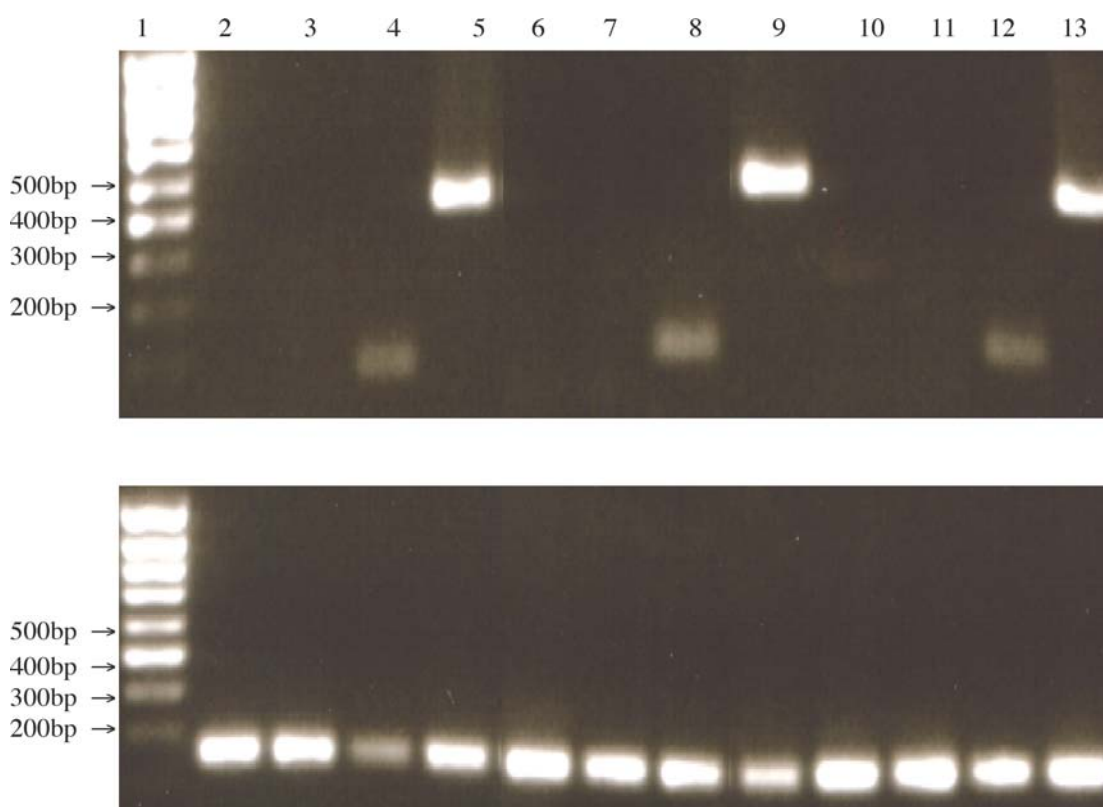


Abbildung 21: Aldolase- und Vektor-spezifische RT-PCRs

Die RT-PCRs wurden gemäß den Angaben in Kapitel 2.2.1.5 durchgeführt. Der obere Teil der Abb. zeigt die Vektor-spezifischen RT-PCRs (468 bp PCR-Produkt bei MTMR-Transfektanten, 161 bp bei Kontroll-Transfektanten, kein PCR-Produkt bei Ausgangszelllinien). Der untere Teil der Abb. zeigt die *ALD*-spezifischen RT-PCRs (249 bp PCR-Produkt in allen Zelllinien). 1: jeweils DNA-Längenmarker; 2: 257P; 3: 257RNOV; 4: 257RNOV/Kontrolle; 5: 257RNOV/MTMR; 6: 257P; 7: 257RDB; 8: 257RDB/Kontrolle; 9: 257RDB/MTMR; 10: A2780P; 11: A2780RCIS; 12: A2780RCIS/Kontrolle, 13: A2780RCIS/MTMR (nach Kowalski *et al.*, 2005).

3.2.3 Zelluläre Effekte der MTMR-Expression

In weiteren Analysen wurde untersucht, wie sich die MTMR-Expression einerseits auf die spezifische Expression der ABC-Transporter MDR1, BCRP und MRP2 und andererseits auf den Multidrug-Resistenz-Phänotyp der transfizierten Zellen auswirkt.

3.2.3.1 Expression der ABC-Transporter

In den drei multidrug-resistenten Zelllinien 257RDB, 257RNOV und A2780RCIS konnte das MTMR mit Hilfe des eukaryotischen Vektors pIRES2/MTMR exprimiert werden (siehe Kap. 3.2.2). Anschließend wurde experimentell geprüft, ob dadurch die ABC-Transporter-spezifischen Genexpressionen für *MDR1* (257RDB/MTMR-Transfektanten), *BCRP* (257RNOV/MTMR-Transfektanten) und *MRP2* (A2780RCIS/MTMR-Transfektanten) vermindert wurden.

3.2.3.1.1 Quantitative Analyse der ABC-Transporter mRNA-Expression

Die Effizienz der MTMR-vermittelten Inhibition der ABC-Transporter mRNAs wurde mit Hilfe der quantitativen *real-time* RT-PCR ermittelt (s. Kap. 2.2.1.20). Hinsichtlich der *MDR1*-Expression wurden 39 257RDB/MTMR- und sechs 257RDB/Kontroll-Transfektanten untersucht. In Bezug auf die *BCRP*-Expression wurden 30 257RNOV/MTMR- und sieben 257RNOV/Kontroll-Transfektanten analysiert. Für die Bestimmung der *MRP2*-Expression wurden 35 A2780RCIS/MTMR- und 12 A2780RCIS/Kontroll-Zelllinien quantifiziert. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die Kontrolltransfektanten eine ähnlich hohe ABC-Transporterexpression aufwiesen, wie die Ausgangszelllinien. In den transfizierten Magenkarzinomzelllinien 257RDB und 257RNOV konnte bei über 50 % der MTMR-exprimierenden Transfektanten eine starke Inhibition der ABC-Transporter-mRNA detektiert werden. In den Ovarialkarzinomzelllinien A2780RCIS/MTMR wurde bei 37 % der Klone eine sehr deutliche Herunterregulation der *MRP2*-mRNA auf unter 50 % des Ausgangsniveaus gemessen. Die Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCR sind im Einzelnen in Tab. 12 zusammengefaßt und in Abb. 22 graphisch dargestellt.

Tabelle 12: ABC-Transporterexpression in MTMR-exprimierenden Zelllinien

Transfektanten	starke Inhibition*	moderate Inhibition**	geringe/keine Effekte***
257RDB/MTMR	20 Klone (51 %)	14 Klone (36 %)	5 Klone (13 %)
257RNOV/MTMR	16 Klone (53 %)	11 Klone (37 %)	3 Klone (10 %)
A2780RCIS/MTMR	13 Klone (37 %)	8 Klone (23 %)	14 Klone (40 %)
* Herunterregulation zwischen 50-100 %			
** Herunterregulation zwischen 10-49 %			
*** Herunterregulation zwischen 0-9 %			

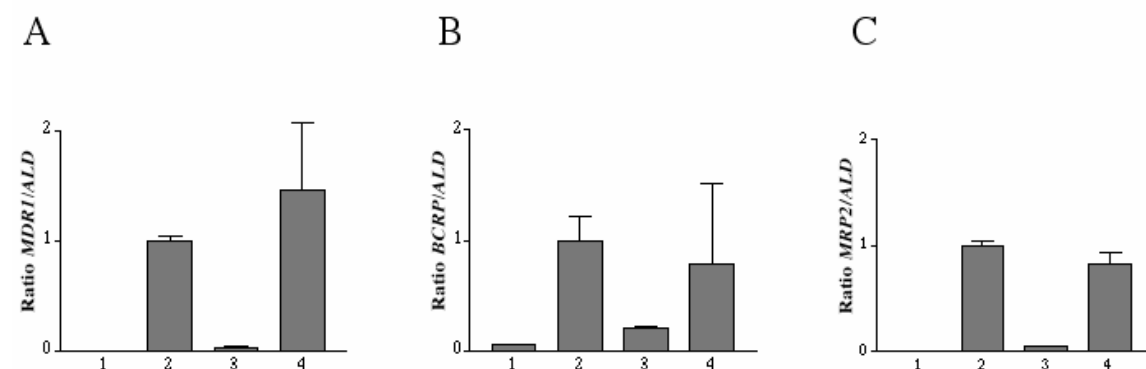


Abbildung 22: Quantifizierung der ABC-Transporter mRNAs

- A: Relative mRNA-Expression des ABC-Transporters *MDR1*. 1: 257P; 2: 257RDB; 3: 257RDB/MTMR; 4: 257RDB/Kontrolle
- B: Relative mRNA-Expression des ABC-Transporters *BCRP*. 1: 257P; 2: 257RNOV; 3: 257RNOV/MTMR; 4: 257RNOV/Kontrolle
- C: Relative mRNA-Expression des ABC-Transporters *MRP2*. 1: A2780P; 2: A2780RCIS; 3: A2780RCIS/MTMR; 4: A2780RCIS/Kontrolle (nach Kowalski *et al.*, 2005).

Die klassische multidrug-resistente Magenkarzinomzelllinie 257RDB weist verglichen mit der sensitiven, parentalen Zelllinie 257P eine 6126-fache Überexpression der *MDR1*-kodierenden mRNA auf. Durch die Expression des MTMR konnte diese Überexpression auf 3 % des Ausgangswertes gesenkt werden, d.h. daß 97 % der Genexpression inhibiert werden konnten (Abb. 22 A).

Die atypisch multidrug-resistente Zelllinie 257RNOV weist eine 18,8-fache Überexpression der spezifischen *BCRP*-mRNA verglichen mit der sensitiven, parentalen Zelllinie 257P auf. Durch die Expression des MTMR konnte in den MTMR-exprimierenden Transfektanten die *BCRP*-Expression um bis zu 80 % inhibiert werden (Abb. 22 B).

Der Vergleich der atypisch multidrug-resistenten Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS und der parentalen, nicht-resistenten Variante A2780P ergibt, daß die *MRP2*-kodierende mRNA in den multidrug-resistenten Zellen 126-fach

ERGEBNISSE

überexprimiert ist. In dieser Zelllinie bewirkte die Expression des MTMRs eine Verringerung des *MRP2*-mRNA-Level auf bis zu 4 % des Ausgangswertes, also eine Inhibition von 96 % (Abb. 22 C).

3.2.3.1.2 Effekt des MTMR auf die ABC-Transporter Proteinexpression

Mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden konnte der zelluläre Proteingehalt der ABC-Transporter in den MTMR-exprimierenden Zellen bestimmt werden. Zum einen wurde mit Western Blot-Analysen die Expression des MDR1/P-Gp-Proteines in den Zelllinien 257P, 257RDB und abgeleiteten Klonen sowie der des Proteins BCRP in den Zelllinien 257P, 257RNOV und abgeleiteten Klonen ermittelt (siehe Kap. 2.2.1.23). Zum anderen wurden von allen untersuchten Zelllinien immunzytochemische Analysen durchgeführt (s. Kap. 2.2.3.6).

In Übereinstimmung mit den Daten aus der quantitativen *real-time* RT-PCR geht aus den Western Blot-Analysen hervor, daß durch die Expression des MTMRs der Proteingehalt von MDR1/P-gp in den klassischen, multidrug-resistenten Zellen und der des BCRP in den atypisch, multidrug-resistenten Zellen derart reduziert war, daß er das Niveau der korrespondierenden sensitiven Zelllinie 257P erreichte (s. Abb. 23).

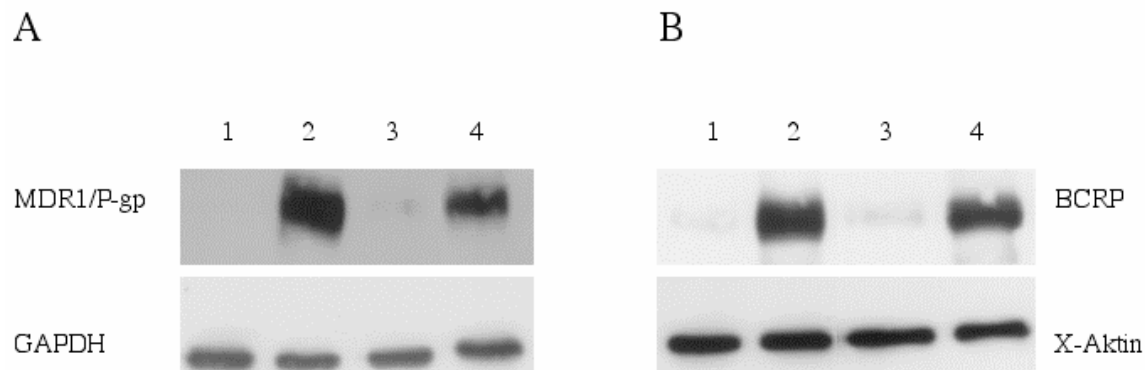


Abbildung 23: Bestimmung des ABC-Transporter-Proteingehaltes durch Western Blots

A: Bestimmung des Proteingehaltes von MDR1/P-Gp (170 kDa, obere Banden) mit Hilfe des mAb C219 und zur Ladungskontrolle von GAPDH (37 kDa, untere Banden,) mit dem mAb anti-GAPDH. 1: 257P; 2: 257RDB; 3: 257RDB/MTMR; 4: 257RDB/Kontrolle.

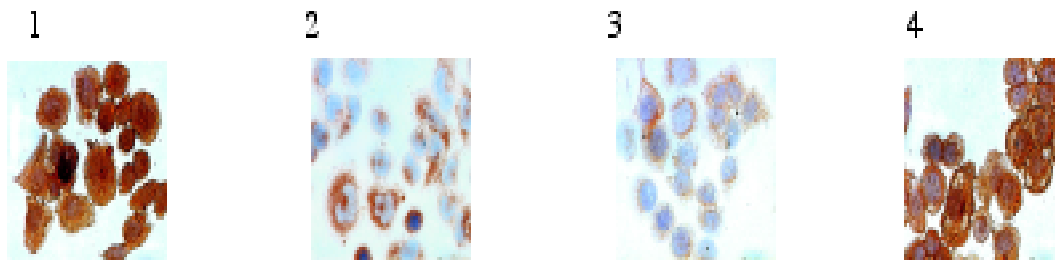
B: Bestimmung des Proteingehaltes von BCRP (72 kDa, obere Banden) mit Hilfe des mAb BXP-21 und zur Ladungskontrolle von X-Aktin (42 kDa; untere Banden) mit dem mAb anti-X-Aktin. 1: 257P; 2: 257RNOV; 3: 257RNOV/MTMR; 4: 257RNOV/Kontrolle (nach Kowalski *et al.*, 2005).

Die Proteinlevel MDR1/P-Gp, BCRP und MRP2 wurden darüber hinaus mit Hilfe von monoklonalen AK in den Ausgangszelllinien sowie deren Transfektanten immunzytochemisch bestimmt (s. Abb. 24). Diese Methode bestätigte die Western Blot-Ergebnisse für MDR1/P-Gp sowie BCRP und diente zur Detektion des MRP2-

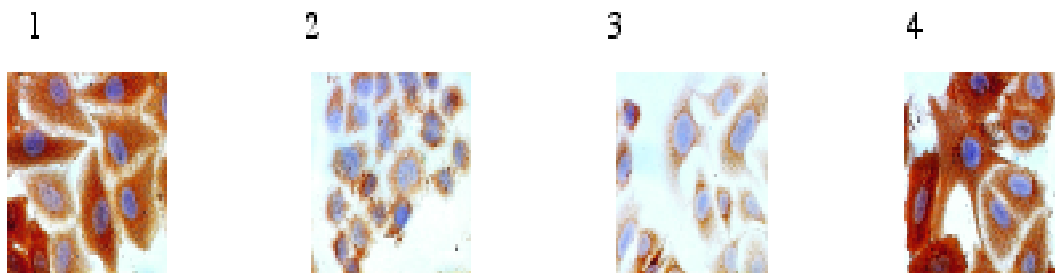
ERGEBNISSE

Proteingehaltes in den Ovarialkarzinomzelllinien, der trotz umfangreicher experimenteller Variationen mittels Western Blot nicht zu bestimmen war.

A MDR1/P-Gp Expression



B BCRP Expression



C MRP2 Expression

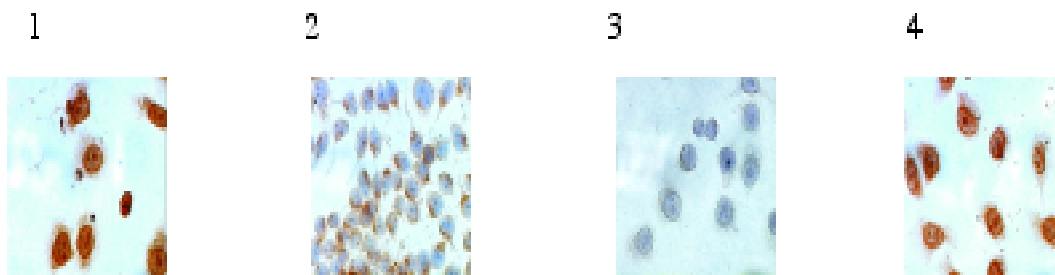


Abbildung 24: Immunzytochemische Detektion der ABC-Transporter

Die Expression der Proteine MDR1/P-Gp, BCRP und MRP2 wurde von Dr. Pawel Surowiak immunzytochemisch mit Hilfe von mAb detektiert (s. Kap. 2.2.3.6) (nach Kowalski *et al.*, 2005).

- A: Immunzytochemische Bestimmung von MDR1/P-Gp mit Hilfe des anti-MDR1-mAb C219 (Alexis, USA). 1: 257RDB; 2: 257P; 3: 257RDB/MTMR; 5: 257RDB/Kontrolle.
- B: Immunzytometrische Detektion von BCRP mit Hilfe des anti-BCRP-mAb BXP-21 (Alexis, USA). 1: 257RNOV; 2: 257P; 3: 257RNOV/MTMR; 4: 257RNOV/Kontrolle.
- C: Immunzytometrische Detektion von MRP2 mit Hilfe des anti-MRP2-mAb MRP2clone4-2 (Monosan, USA). 1: A2780RCIS; 2: A2780P; 3: A2780RCIS/MTMR; 4: A2780RCIS/Kontrolle.

Durch die immunzytometrische Detektion der ABC-Transporter konnte gezeigt werden, daß in den multidrug-resistenten Zelllinien 257RDB, 257RNOV und A2780RCIS der jeweilige ABC-Transporter (MDR1, BCRP, MRP2) im Vergleich zu den korrespondierenden parental, sensitiven Zelllinien 257P bzw. A2780P überexprimiert ist. Gleiches trifft für die von den resistenten Zelllinien abgeleiteten Kontrolltransfektanten zu, die den unmodifizierten Vektor pIRES2/EGFP exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigten alle MTMR-exprimierenden Transfektanten (257RDB/MTMR; 257RNOV/MTMR, A2780RCIS/MTMR) entweder gar keine oder nur sehr schwache ABC-Transporter Expression, die mit denen der jeweiligen parental, sensitiven Zelllinien 257P bzw. A2780P vergleichbar war. Damit konnten die Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT-PCR und der Western Blot-Analysen (im Fall von MDR1/P-Gp und BCRP) mit einer weiteren unabhängigen Methode bestätigt werden. Die MTMR-Expression bewirkte demzufolge in allen multidrug-resistenten Zelllinien einen annähernd komplette Ausschaltung der ABC-Transporter Expressionen.

3.2.4 Zytotoxizität der Ausgangszelllinien und Transfektanten gegenüber verschiedenen Zytostatika

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich die Inhibition der ABC-Transporter durch die Expression des anti-ABC-Transporter-MTMRs auf die Multidrug-Resistenz der transfizierten Zelllinien auswirkt. Dazu wurden in Zytotoxizitätsexperimenten die IC_{50} -Werte der einzelnen Zelllinien gegenüber demjenigen Zytostatikum bestimmt, welches ein Substrat des jeweiligen ABC-Transporters darstellt. In den Zelllinien 257P sowie 257RDB und abgeleiteten Transfektanten wurde die Zytotoxizität gegenüber Daunorubicin (DNR) getestet, in den Zelllinien 257P sowie 257RNOV und abgeleiteten Transfektanten wurden die IC_{50} -Werte der Zellen gegenüber Mitoxantron (MX) und in den Ovarialkarzinomzelllinien A2780P sowie A2780RCIS und abgeleiteten Transfektanten wurde die Zytotoxizität gegenüber Cisplatin (CisPt) bestimmt (s. Kap. 2.2.3.4).

In der MTMR-exprimierenden Transfektante 257RDB/MTMR wurde im Vergleich zur klassisch multidrug-resistenten Ausgangszelllinie 257RDB eine komplette Aufhebung der Daunorubicinresistenz erreicht (100 % Reversion der DNR-Resistenz, $p < 0,01$). In den 257RNOV/MTMR-Zellen konnte eine drastischen Reduktion der

ERGEBNISSE

Mitoxantronresistenz im Vergleich zur atypisch multidrug-resistenten Ausgangszelllinie 257RNOV detektiert werden. Die IC_{50} -Werte ergeben eine MX-Reversion um 94 % ($p < 0,001$). Die Cisplatinresistenz der MTMR-exprimierenden Transfektante A2780RCIS/MTMR war im Vergleich zu ihrer multidrug-resistenten Ausgangslinie A2780RCIS um 63 % ($p < 0,01$) verringert.

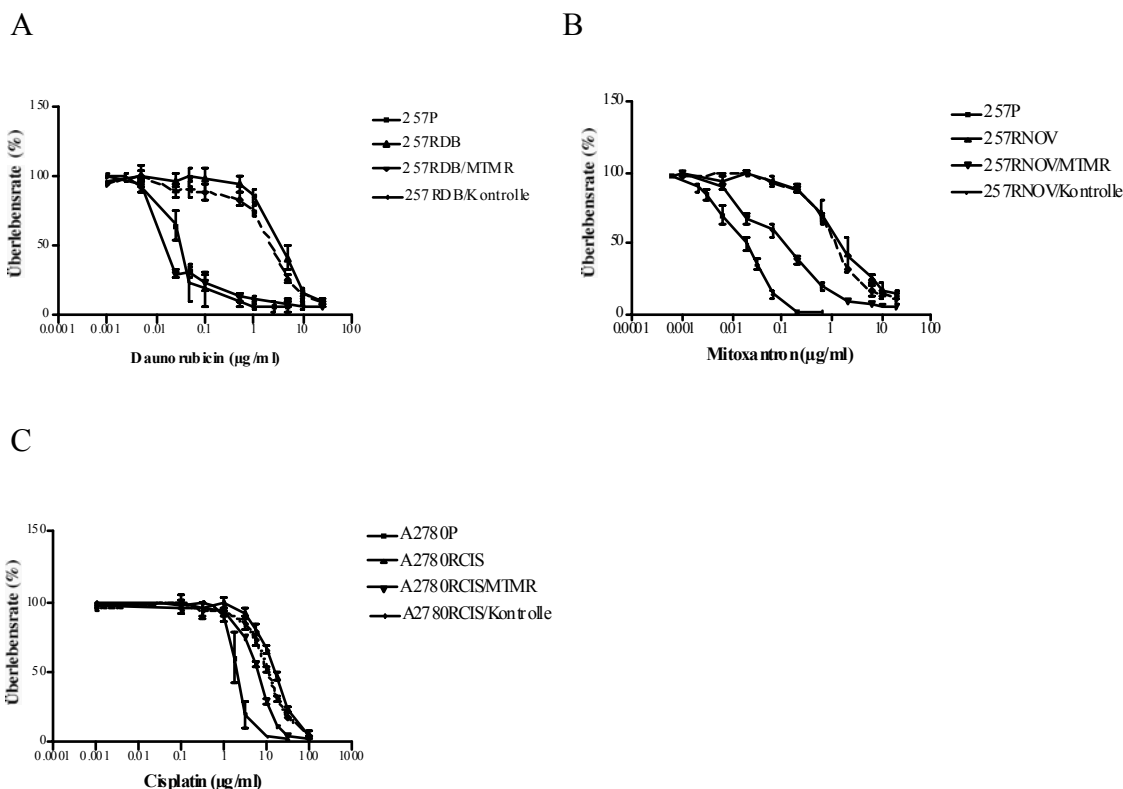


Abbildung 25: Zytotoxizität der untersuchten Zelllinien

Die Resistenzen aller Zelllinien gegenüber verschiedener Zytostatika wurden im Proliferations-Assay (s. Kap. 2.2.3.4) bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

- A: Resistenzbestimmung der parental, sensitiven 257P Zelllinie, der klassisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RDB und ihrer abgeleiteten Transfektanten gegenüber Daunorubicin.
- B: Resistenzbestimmung der parental, sensitiven 257P Zelllinie, der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RNOV und abgeleiteter Transfektanten gegenüber Mitoxantron.
- C: Resistenzbestimmung der parental, sensitiven A2780P Zelllinie, der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie A2780RCIS und abgeleiteter Transfektanten gegenüber Cisplatin.

Tab. 13 gibt Auskunft über die ermittelten IC_{50} -Werte mit den dazugehörigen p-Werten und den Resistenzfaktoren für alle untersuchten Zelllinien.

Tabelle 13: IC₅₀-Werte und Resistenzfaktoren der untersuchten Zelllinien

Zelllinie	Zytostatikums-resistenz	IC ₅₀ (µg/ml) ¹	Resistenz-faktor (x-fach) ²	p-Wert ³
257P	DNR	0,03±0,02	1	
257RDB	DNR	3,5±1,17	97	0,025 ⁴
257RDB/MTMR	DNR	0,015±0,001	0,5	0,072 ⁵
257RDB/ Kontrolle	DNR	2,5±0,5	83	0,92 ⁵
257P	MX	0,018±0,003	1	
257RNOV	MX	1,25±0,007	69	< 0,0001 ⁴
257RNOV/ MTMR	MX	0,081±0,002	4,5	< 0,0001 ⁶
257RNOV/ Kontrolle	MX	0,94±0,002	52	0,34 ⁶
A2780P	CisPt	1,98±0,76	1	
A2780RCIS	CisPt	15,98±4,9	8	0,0003 ⁷
A2780RCIS/ MTMR	CisPt	9,68±2,4	4,8	0,031 ⁸
A2780RCIS/ Kontrolle	CisPt	10,5±0,9	5	0,21 ⁸
¹ Die IC ₅₀ -Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Dreifachmessungen dar.				
² Die Resistenzfaktoren beziehen sich jeweils auf die parentale Zelllinie.				
³ Die p-Werte wurden von mindestens drei unabhängig bestimmten IC ₅₀ -Werten mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen t-Testes der <i>Prism3.1a</i> -Software ermittelt.				
⁴ Bezüglich 257P				
⁵ Bezüglich 257RDB				
⁶ Bezüglich 257RNOV				
⁷ Bezüglich A2780P				
⁸ Bezüglich A2780RCIS				

3.2.5 Akkumulation verschiedenener Zytostatika in Ausgangszelllinien und Transfektanten

In der parentalen sensitiven Zelllinie 257P, der klassischen multidrug-resistenten Zelllinie 257RDB sowie in den von ihr abgeleiteten Transfektanten wurde die Akkumulation von Daunorubicin und in der Zelllinie 257P, der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RNOV sowie in den von ihr abgeleiteten Transfektanten die Akkumulation von Mitoxantron mit Hilfe der Durchflußzytometrie (siehe Kap. 2.2.3.5) bestimmt.

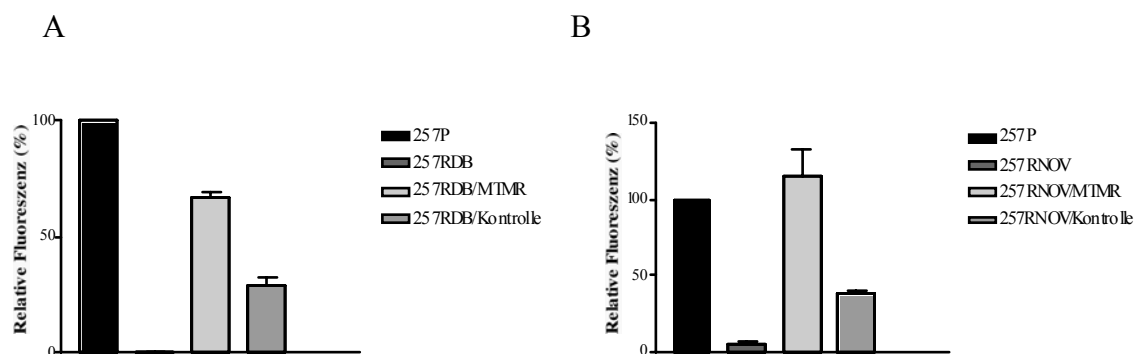


Abbildung 26: Akkumulation von Daunorubicin und Mitoxantron

Wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben wurde die Akkumulation von DNR in den Magenkarzinomzelllinien 257P, 257RDB sowie in deren Transfektanten und die Akkumulation von MX in 257P, 257RNOV sowie in deren Transfektanten mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Experimenten dar (nach Kowalski *et al.*, 2005).

- A: Relative Akkumulation von Daunorubicin der Zelllinie 257P, der klassisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RDB und ihrer abgeleiteten Transfektanten.
 B: Relative Akkumulation der Zelllinie 257P, der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RNOV und ihrer abgeleiteter Transfektanten.

In der klassisch multidrug-resistenten Zelllinie beträgt die relative Akkumulationsrate von Daunorubicin 0,1 % der parentalen Zelllinie 257P. Durch die Expression des MTMRs in den 257RDB/MTMR-Zellen konnte die Akkumulationsrate gegenüber Daunorubicin drastisch gesteigert werden, auf 67 % des Wertes der parentalen 257P Zelllinie.

Die Akkumulation von Mitoxantron in der atypisch multidrug-resistenten Zelllinie 257RNOV entspricht etwa 5 % des Wertes der parentalen 257P Zelllinie. Hier konnte die MTMR-Expression die Akkumulation in den 257RNOV/MTMR-Transfektanten um 100 % auf das Niveau der parentalen 257P Zelllinie anheben.

Sowohl bezüglich der Daunorubicin- als auch der Mitoxantronakkumulation wurden in den Kontroll-Transfektanten 257RDB/Kontrolle und 257RNOV/Kontrolle, die den unmodifizierten Vektor pIRES2/EGFP exprimieren, im Vergleich zu den MTMR-Transfektanten geringere, aber dennoch signifikante Effekte in der Zytostatikaakkumulation gemessen.

Aufgrund der fehlenden Fluoreszenzeigenschaften von Cisplatin konnten in den Zelllinien A2780P und A2780RCIS sowie in deren abgeleiteten Transfektanten keine Akkumulationsmessungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Idee und Hintergrund der Multitarget-Spaltung

Die Chemotherapie mit zytotoxischen Substanzen ist eine wichtige Therapieform bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Allerdings entwickeln Tumorzellen häufig gegen die eingesetzten Therapeutika Multidrug-Resistenzen (MDR), die die Hauptursache für das Scheitern einer Chemotherapie sind. Aufgrund dieser Problematik ist es von grundlegender Bedeutung, MDR-verursachende Gene in Tumorzellen zu identifizieren und möglicherweise therapiebegleitend auszuschalten. Der Einsatz von pharmakologisch aktiven Substanzen, die den zellulären resistenzverursachenden Alterationen entgegenwirken, sogenannten MDR-Modulatoren, hat in der Vergangenheit sowohl in Zellkulturen als auch in der therapeutischen Praxis immer wieder das Phänomen der tertiären Resistenz mit sich gebracht. Das bedeutet, daß die Tumorzellen neben ihrer intrinsischen/primären und erworbenen/sekundären MDR auch gegen die MDR-Modulatoren Resistenzmechanismen ausbilden können und damit die Wirksamkeit dieser Substanzen aufgehoben ist. Dieses Phänomen ist bislang für RNA-basierte Agenzien noch nicht beschrieben worden. Daher gilt die Entwicklung von RNA-Strategien als vielversprechende Alternative, um MDR-assozierte Gene in ihrer Expression auszuschalten und damit zur Überwindung von Chemoresistenzen beizutragen. Die Transkripte von MDR-assozierten ABC-Transportern stehen dabei besonders im Fokus der Forschung. Mit Hilfe des gesamten Methodenspektrums an RNA-Strategien (s. Kap. 1.3) konnte beispielsweise die *MDR1*-mRNA inhibiert werden: angefangen von der Applikation von *Antisense*-Oligonukleotiden (Liu *et al.*, 1996; Stuart *et al.*, 2000, Rittierodt *et al.*, 2004), über die Anwendung von *Hammerhead*-Ribozymen (Holm *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994), *small interfering* RNAs (Nieth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2005) bis hin zu *short hairpin* RNAs (Steger *et al.*, 2004; Yagüe *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind siRNAs (Ee *et al.*, 2004) und *Hammerhead*-Ribozyme gegen die mRNA des ABC-Transporters BCRP (Kowalski *et al.*, 2001; Kowalski *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*,

2004) sowie MRP1 (Osada *et al.*, 2003) und MRP2 (Materna *et al.*, 2001; Materna *et al.*, 2005) beschrieben worden.

Das Phänomen der Multidrug-Resistenz ist im zellulären Kontext jedoch meist nicht auf die Veränderung eines Genes zurückzuführen, sondern stellt sich als ein Multikomponentensystem dar, welches durch Kaskaden oder unabhängige Expressionen verschiedener Gene verursacht wird.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig ein Multitargetmultiribozym (MTMR), welches durch die Kombination von *in cis*- und *in trans*-aktiven *Hammerhead*-Ribozymen sowie *SPACER*-Sequenzen befähigt ist, die Transkripte dreier unabhängiger Gene, die für die ABC-Transporter MDR1/P-gp, MRP2 und BCRP kodieren, simultan funktionell auszuschalten.

Sogenannte Multitarget-Ribozyme (MTR) wurden in anderen Zusammenhängen bereits beschrieben. Dieser Begriff bezieht sich allerdings auf die tandemartige Anordnung mehrerer Ribozyme, die gegen verschiedene Sequenzabschnitte eines RNA-Moleküles gerichtet sind. Zum einen konnten durch die Kombination zweier Monoribozyme zwei konservierte Positionen des Retrovirus S1-Gensegmentes, das das virale Zelladhäsionsprotein $\sigma 1$ kodiert, gespalten werden (Shahi *et al.*, 2002). Zum anderen erzielten Chen *et al.* (1992) durch die Expression verschiedener Mono-, Di-, Tetra-, Penta- und Nona-Ribozyme die Spaltung der HIV-*env*-RNA an bis zu neun verschiedenen Positionen. Die genannten antiviralen MTR-Konstrukte können als gentherapeutische Agenzien gegen ein einzelnes Transkript angewendet werden; doch aufgrund von fehlenden *SPACER*-Sequenzen und *in cis*-aktiven Ribozymen verfügen sie nicht über das Potential zur Spaltung mehrerer unabhängiger RNA-Moleküle.

4.1.1 Das Multitargetmultiribozym-Reaktionssystem

Um die Transkripte der ABC-Transporter MDR1, MRP2 und BCRP simultan zu inhibieren, wurden *Hammerhead*-Ribozyme, die diese Transkripte angreifen, und sogenannte *SPACER*-RNA-Sequenzen in einem Multitarget-Multiribozym (MTMR) dergestalt miteinander kombiniert, daß die *SPACER*-Sequenzen von den *in cis*-aktiven Ribozymen gespalten werden können, wodurch es zur Autokatalyse des MTMRs und zur Freisetzung der *in trans*-spaltenden Ribozyme kommt, die daraufhin ihre Ziel-RNAs katalysieren können. Die Idee von autokatalytisch aktiven, selbst-prozessierenden Ribozymen wurde bereits von Taira *et al.* (1990, 1991) entwickelt.

Dabei konnte ein *in trans*-agierendes Ribozym, welches gegen die mRNA des Hefe-spezifischen *SFL1*-Genes gerichtet war, durch ein *in cis*-spaltendes Ribozym freigesetzt werden, dessen Sequenz am 3'-Ende des Konstruktes lokalisiert war (Taira *et al.*, 1990; Taira *et al.*, 1991). Im Fokus dieser Arbeiten steht allerdings die Expression von "maßgeschneiderten" Ribozymsequenzen mit definierten 5'- und 3'-Enden, die vergleichsweise effektiver sind als nicht-prozessierte Kontroll-Ribozyme, die aufgrund der Beschaffenheit herkömmlicher Expressionsvektoren meist Bestandteil eines langen Transkriptes sind.

4.1.2 Konstruktion des MTMRs

Das Multitargetmultiribozym setzt sich aus folgenden Einzelsequenzen zusammen: anti-MRP2-Ribozym, anti-BCRP-Ribozym, 3 x anti-MDR1-Ribozym, 3 x MDR1-SPACER. Es gibt 21 verschiedene Möglichkeiten, diese Bestandteile miteinander zu kombinieren. Um diejenige Sequenz zu detektieren, die die funktionellen Anforderungen des Multitargetmultiribozymes am besten erfüllt, wurde im Vorfeld von experimentellen Untersuchungen eine *in silico*-Analyse aller MTMR-Varianten durchgeführt. Dabei wurden die von speziellen Computerprogrammen berechneten MTMR-RNA-Sekundärstrukturen herangezogen und bezüglich der im Ergebnisteil dargestellten Auswahlkriterien untersucht.

RNA-Sekundärstrukturen können *in silico* mit Hilfe der Programme *mfold 3.0* und *Sfold 2.0* erzeugt werden. Bei der Bewertung der MTMR-Varianten mit Hilfe von *mfold 3.0* wurde von den angebotenen Strukturen gemäß der Benutzerhinweise jeweils diejenige mit der geringsten freien Energie herangezogen (Zuker and Stiegler, 1981; Zuker, 1989). Das *Sfold 2.0*-Programm hingegen bietet eine RNA-Sekundärstrukturanalyse, die nicht nur die optimale, energieärmste RNA-Struktur, sondern auch alternative Faltungen einbezieht. Auf dieser Grundlage wird ein Wahrscheinlichkeitsprofil bezüglich der Anordnung und Einzelsträngigkeit für jedes Nukleotid in der eingegebenen Sequenz erstellt (Ding and Lawrence, 2001). Durch die Bewertung der verschiedenen MTMR-Sekundärstrukturen mit Hilfe zweier Programme, die auf unterschiedlichen Algorithmen basieren, steigt die Wahrscheinlichkeit, daß übereinstimmende Strukturen unter den angegebenen Bedingungen tatsächlich vorliegen. Trotzdem sind die im Folgenden dargestellten möglichen Fehlerquellen bei der Auswertung von *in silico* erzeugten Sekundärstrukturen zu beachten:

DISKUSSION

1. Die Berechnung von RNA-Sekundärstrukturen mit computergestützten Modellierungsprogrammen stellt lediglich eine wahrscheinliche Annäherung an die tatsächliche Sekundärstruktur dar. Hundertprozentige Voraussagen sind mit Hilfe der verfügbaren Programme nicht möglich.
2. Der Zusammenhang zwischen RNA-Sequenz und Tertiärstruktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt und kann im zellulären Umfeld, z.B. durch RNA-bindende Proteine, dergestalt beeinflusst werden, daß die für die computergestützte Simulation verwendeten Parameter nicht mehr zutreffen bzw. irrelevant geworden sind (Lee *et al.*, 1997).

Die Bindung des Ribozymes an sein Substrat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ribozymatischen Spaltreaktion (Hendry und McCall, 1995). Da die im MTMR integrierten *Hammerhead*-Ribozymsequenzen einen jeweils identischen katalytischen Kern besitzen, kann die Reaktionsrate nur durch die Sekundärstruktur der Hybridisierungssequenzen beeinflusst werden. Intramolekulare Schleifenstrukturen oder Aggregate können zur sterischen Hinderung bei der Ausbildung des Ribozym-Substrat-Komplexes führen bzw. die Reaktionsrate erniedrigen, da die Nukleotide der Hybridisierungsarme bereits im Molekül gebunden sind (Stage-Zimmermann and Uhlenbeck, 1998). Einige Studien befürworten die Hypothese, daß ein hoher Anteil an freien Nukleotiden in den Bindungsarmen von Ribozymen die Reaktionsrate der ribozymatischen Spaltung erhöht. Allerdings ist diese Aussage hypothetischer Natur und konnte noch nicht abschließend belegt werden. Einer Studie von Amarzguioui *et al.* (2000) zufolge ist die Erreichbarkeit einer RNA-Zielsequenz nicht nur vom Vorhandensein von Einzelstrangbereichen, sondern auch von alternativen Parametern abhängig, die jedoch noch nicht determiniert werden konnten. Aufgrund der in mehreren Studien übereinstimmenden Meinung, daß ein hoher Anteil freier Nukleotide in den Hybridisierungsarmen von Ribozymen sowie in der Zielregion der dazugehörigen mRNA die Ausbildung des Ribozym-Substrat-Komplexes erleichtert (Ding and Lawrence, 2001, Ding and Lawrence, 2003, Ding *et al.*, 2004), wurde die Anzahl der freien Nukleotide in den Hybridisierungsarmen der im MTMR integrierten Ribozymsequenzen sowie die Ausbildung der typischen *Hammerhead*-Struktur und die sterische Zugänglichkeit der Hybridisierungsarme als Bewertungskriterien für die *in silico*-Analyse zugrunde gelegt.

4.1.3 Auswahl der Ziel-RNA-Sequenzen

Als Substrat-RNAs wurden Abschnitte aus den jeweiligen mRNAs der Zielgene *MDR1*, *MRP2* und *BCRP* ausgewählt, die lang genug sind, um Rückschlüsse auf die vollständige mRNA zuzulassen. Die Substrat-RNAs wurden in vorangehenden Analysen bereits mit Hilfe von Einzel-Ribozymen *in vitro* mit einer hohen Effizienz hydrolisiert. In den nachfolgenden Anwendungen der Mono-Ribozyme in verschiedenen Zellkultursystemen konnte ebenfalls eine starke Erniedrigung der Ziel-mRNA nachgewiesen werden. Diese Analysen zeigen, daß die ausgewählten Substrat-RNAs für die *in vitro*-Bewertung von Ribozymsequenzen geeignet sind und eine positive Korrelation zwischen hoher Effizienz im zellfreien System und in zellulärer Umgebung besteht.

4.2 Aktivität des *in vitro*-transkribierten MTMR

Der Mechanismus der ribozymatischen Spaltung wurde als sequenzspezifische alkalische Hydrolyse unter Beteiligung von Mg^{2+} beschrieben (Dahm *et al.*, 1991). Es ergibt sich daraus eine Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert, der Mg^{2+} -Konzentration und der Temperatur. Durch das biologische System, in dem die ribozymatische Spaltung Anwendung finden soll, sind diese Parameter vorgegeben (in diesem Fall humane Zellen). Deshalb richtete sich die Optimierung der Katalysereaktion auf die MTMR- bzw. die Ziel-RNA-Sequenzen und nicht auf die Reaktionsbedingungen. Diese wurden so gewählt, daß sie sich den physiologischen Verhältnissen in der Zelle weitestgehend annähern (pH 7,5, Mg^{2+} -Konzentration 12 mM, Reaktionstemperatur 37 °C). Eine Studie bewertet den intrazellulären Gehalt von Mg^{2+} -Ionen zwar deutlich niedriger (0,1-1 mM) als die hier im zellfreien System angewandten 12 mM (London, 1991), jedoch wird eine Mg^{2+} -Konzentration zwischen 10-50 mM übereinstimmend für kinetische Analysen von *Hammerhead*-Ribozymen empfohlen (Uhlenbeck, 2003, Kato *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es Indizien, daß Komponenten mit geringem Molekulargewicht (*low molecular weight components*) in Zellen die fehlenden Mg^{2+} -Ionen kompensieren (Nedbal and Sczakiel, 1997).

4.2.1 Bewertung des *in vitro*-transkribierten MTMRs im zellfreien System

Das Multitargetmultiribozym wurde hinsichtlich seiner Reaktionsparameter genauer analysiert und die erhaltenen kinetischen Daten mit den publizierten Reaktionsparametern der im MTMR integrierten Monoribozyme sowie ausgewählter Ribozyme, die unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen ermittelt wurden, verglichen (s. Tab. 11 im Ergebnisteil). Sowohl im Vergleich mit den Monoribozymen gegen die Substrate MDR1_{sub}, BCRP_{sub} und MRP2_{sub}, als auch zu den Daten von Ribozymen, die gegen vollkommen andere Substrat-RNAs gerichtet sind, zeigt sich, daß die Spaltaktivität der durch Autokatalyse freigesetzten MTMR-Fragmente nicht als vermindert, sondern vielmehr als hoch einzuschätzen ist.

Da die *a priori*-Bewertung ribozymatischer Aktivität im zellfreien System ein geeignetes Hilfsmittel ist, um die Eignung der gegebenen Konstrukte für Zellkulturanwendungen einzuschätzen (Sigurdsson and Eckstein, 1995), ist analog zu den Ergebnissen der Monoribozyme anti-MDR1, anti-BCRP und anti-MRP2 (Holm *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 2001 und 2002; Materna *et al.*, 2001 und 2005) eine hohe Effizienz des MTMR im zellulären Kontext zu erwarten.

4.3 Anwendung des MTMRs in verschiedenen Zellsystemen

Durch stabile Expression des MTMRs mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionsvektors sollte determiniert werden, ob die im zellfreien System beobachtete Substratspaltung auch in verschiedenen Zellsystemen erfolgt und daraus eine Inhibition der Ziel-mRNA sowie physiologische Effekte abzuleiten sind.

4.3.1 Etablierung stabiler MTMR- und Kontroll-Transfektanten der Zelllinien 257RNOV, 257RDB und A2780RCIS

Aus den drei genannten chemoresistenten Zelllinien wurden stabile Transfektanten etabliert, die entweder den unmodifizierten Expressionsvektor pIRES2/EGFP (Kontrolltransfektanten) oder den Expressionsvektor pIRES2/MTMR mit integrierter MTMR-Sequenz (MTMR-Transfektanten) exprimieren. Die Auswahl der drei chemoresistenten Zelllinien für die Anwendung des MTMR begründete sich zum einen aus der Tatsache, daß jeweils eine der Ziel-mRNAs für die im MTMR integrierten Ribozyme im Vergleich zu ihrer parentalen chemosensitiven Variante überexprimiert ist, und zum anderen dadurch, daß die gleichen Ziel-mRNAs in diesen Zelllinien bereits durch Monoribozyme sowie siRNAs und z.T. durch shRNAs reguliert wurden, was einen Vergleich der Effizienzen der unterschiedlichen *Antisense*-Techniken ermöglicht (Holm *et al.*, 1994; Kowalski *et al.*, 2002; Nieth *et al.*, 2003; Stege *et al.*, 2004; Materna *et al.*, 2005; Pribsch *et al.*, 2006, eingereicht).

4.3.1.1 Auswahl des Vektorsystemes und Klonierung der MTMR-Sequenz

Trotz einer effizienten Spaltung von Ziel-RNA durch *Hammerhead*-Ribozyme im zellfreien System ist eine erfolgreiche Applikation der gleichen Ribozyme in zellulärer Umgebung (*in vitro* und/oder *in vivo*) nicht automatisch gewährleistet. Mögliche Gründe für diese unzureichende Übertragbarkeit sind:

1. Die Substrat-mRNA liegt als gefaltete Raumstruktur vor, die sich aufgrund der spezifischen Verhältnisse in der jeweiligen Zelle höchstwahrscheinlich anders gestaltet als im zellfreien System. Zudem kann die Ribozymschnittstelle in der Ziel-mRNA durch an sie gebundene Proteine abgeschirmt sein.
2. Es ist in der Regel ein Überschuß an Ribozym erforderlich, um die Ziel-mRNA signifikant zu inhibieren. Bei der Expression der Ribozymsequenz durch ein

Vektorsystem kann dieses möglicherweise nicht gewährleistet sein (z.B. durch sogenanntes "*silencing*" des vektoriellen Promotors durch benachbarte schwach exprimierende genomische Bereiche).

3. Verschiedene zelluläre RNasen können die Ribozyme degradieren und damit ihrer Funktionalität entgegenwirken.
4. Die gespleißte mRNA wird schnell vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Daher müssen aktive Ribozyme auch ins Zytoplasma transportiert werden, um Kolokalisation mit ihrer Ziel-RNA zu gewährleisten (Hormes *et al.*, 1997).

Aus den genannten Gründen erfordert ein Ribozym- bzw. MTMR-Expressionssystem eine hohe Produktionsrate an stabiler katalytisch aktiver RNA, die zytoplasmatisch lokalisiert ist. Der eukaryotische Expressionsvektor pIRES2/EGFP erfüllt diese Kriterien bezüglich der MTMR-Expression in den entsprechenden Zielzelllinien. Das MTMR konnte stabil im Genom integriert und permanent exprimiert werden. Der im Vektor integrierte *CMV*-Promotor sorgt generell für eine hohe Transkriptionsrate in allen getesteten Zellsystemen. Darüber hinaus rekrutiert dieser Promotor die Polymerase II, die sich bei Ribozymanwendungen als vorteilhaft erwiesen hat. Es zeigte sich hierbei, daß Ribozyme, die die für die Polymerase II typische 3'-Polyadenylatschwanzstruktur aufwiesen, stabiler und aktiver waren, als solche, die von einer anderen Polymerase transkribiert wurden (Bertrand *et al.*, 1997).

4.3.1.2 Generierung stabiler Transfektanten

Durch Transfektion sind stabile MTMR- und Kontroll-Transfektanten aus den resistenten Zelllinien 257RNOV, 257RDB und A2780RCIS etabliert worden. Alle Transfektanten wurden hinsichtlich der Expression der inserierten Gensequenz mit Hilfe der RT-PCR kontrolliert. Da keine "falsch-positiven" Klone detektiert wurden, kann auf eine sehr hohe Transfektionseffizienz geschlossen werden. Allerdings stellt der Nachweis der MTMR-Expression mittels RT-PCR noch keine Garantie für die beabsichtigte katalytische Wirkung in der Zelle dar. Aufgrund der zufälligen Integration des Vektors in das Genom der Zielzelle ist durch sog. *Silencing* nicht auszuschließen, daß die MTMR-Expressionseinheit etwa unter die Kontrolle eines schwachen oder nur zeitweise abgelesenen Promotors gelangte und damit die MTMR-Expression beeinträchtigt wurde. Da die PCR eine hochsensitive Methode darstellt, die auch schwach exprimierte Sequenzen nachweisen kann, ist die katalytische Aktivität des MTMRs in funktionellen Untersuchungen zu analysieren.

4.3.2 Funktionelle Untersuchungen der Transfektanten

4.3.2.1 Resistenzverhalten der Transfektanten

Die Transfektion der MTMR-Sequenz in die eingangs genannten resistenten Krebszelllinien sollte zur Inaktivierung der Ziel-mRNAs der Gene *BCRP*, *MRP2* und *MDR1* und damit zur Verringerung des jeweiligen Proteines führen, für das die spezifischen mRNAs kodieren. Es konnte bereits eindeutig gezeigt werden, daß die ABC-Transportproteine durch den aktiven Export spezifischer Zytostatika einen maßgeblichen Anteil am MDR-Phänotyp der Zellen haben (Kowalski *et al.*, 2002; Stege *et al.*, 2004). Umgekehrt müßte eine Verringerung des ABC-Transportergehaltes als Resultat der MTMR-Expression zur Resensitivierung der Zellen gegenüber dem spezifischen Zytostatikum führen.

Alle Transfektanten wurden deshalb hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften gegen die vom jeweiligen ABC-Transporter transportierte Substanz getestet. Als Maßstab für die Bewertung der Resistenz diente die halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration (IC_{50}) des jeweiligen Zytostatikums im Medium, wobei es sich um ein Maß handelt, das bei diesbezüglichen Untersuchungen in der Fachliteratur fast immer angegeben wird (Fricker and Buckley, 1996; Voigt, 2005). Es konnte gezeigt werden, daß die Zelllinie 257RNOV eine 69-fach höhere Resistenz gegen Mitoxantron und die Zelllinie 257RDB eine 97-fach höhere Resistenz gegen Daunorubicin im Vergleich zu ihrer parentalen Zelllinie 257P aufweisen. Dieses Resistenzverhalten ist seit Etablierung dieser Zelllinien unverändert geblieben, was ein Vergleich mit in der Vergangenheit publizierten Daten über die beiden Zelllinien zeigt (Kellner *et al.*, 1997; Stege *et al.*, 2004). Die Kontrolltransfektanten, die den unmodifizierten Expressionsvektor transkribieren, wiesen ein ähnliches Resistenzverhalten auf wie die jeweiligen resistenten Ausgangszelllinien. Bei der Transfektion der resistenten Zelllinie A2780RCIS konnten analoge Ergebnisse erzielt werden. Zum einen ist die spezifische Cisplatinresistenz der Ausgangszelllinie A2780RCIS gegenüber der parentalen Zelllinie A2780P um das Achtfache erhöht und im Vergleich zu vorher publizierten Daten unverändert (Materna *et al.*, 2005). Anderenfalls zeigten die Kontrolltransfektanten einen stabilen MDR-Phänotyp. Die Ergebnisse der MTMR-exprimierenden Transfektanten waren nicht ganz einheitlich. In allen drei Zelllinien

DISKUSSION

konnten bei den MTMR-exprimierenden Klonen etwa bei einem Drittel schwache, bei einem weiteren Drittel moderate und bei einem letzten Drittel starke zelluläre Effekte nachgewiesen werden. Diese Inhomogenität könnte aufgrund von Positionseffekten der Transfektion eingetreten sein, d.h. daß durch die zufällige Integration des Vektors in das Genom der Ausgangszellen die Transkription eines bestimmten Genes derart beeinflußt würde, daß sich die zelluläre Resistenz veränderte. Aufgrund der folgenden Argumente ist jedoch ein solcher Effekt auszuschließen:

1. Das Ergebnis sollte mit gleicher Wahrscheinlichkeit in den MTMR-exprimierenden und Kontrolltransfektanten auftreten. Da keine der Kontrolltransfektanten eine Verringerung des spezifischen Resistenzfaktors aufweist, ist der Sensitivierungseffekt auf die MTMR-Expression zurückzuführen.
2. Die Resensitivierung der MTMR-exprimierenden Transfektanten erfolgte in drei unabhängigen Transfektionsanalysen und ist auch für die jeweilige Zelllinie spezifisch, d.h. im Falle von A2780RCIS/MTMR gegen Cisplatin, 257RNOV/MTMR gegen Mitoxantron und 257RDB/MTMR gegen Daunorubicin. Diese Spezifität spricht ebenfalls gegen einen Positionseffekt.
3. Diejenigen Transfektanten, die einen Sensitivierungseffekt zeigen, sollten keine Korrelation mit dem RNA bzw. Proteinniveau des jeweiligen ABC-Transporters aufweisen. Die Analyse aller Transfektantenzelllinien machte jedoch deutlich, daß die zelluläre Sensibilisierung stark mit der Inhibition der ABC-Transporter korreliert.

Aus den genannten Gründen ist bei allen Transfektionsexperimenten ein zellulärer Effekt auf die Expression der MTMR-Sequenz zurückzuführen. Die unterschiedliche Stärke des Sensibilisierungseffektes könnte aufgrund unterschiedlicher MTMR-Expressionsstärken in den Transfektanten entstanden sein, da wie bereits in vorhergehenden Abschnitten erwähnt wurde, die Integration des Expressionsvektor zufällig erfolgt und dieser von benachbarten genomischen Strukturen in seiner Expressionsstärke sowohl positiv als auch negativ beeinflußt werden kann. Die Ergebnisse widerspiegeln einen typischen Verlauf derartig durchgeführter Transfektionsanalysen. Eine durchschnittliche Drittelung der Transfektanten in solche mit schwachen, moderaten und starken Effekten hat sich zum einen hier in drei unabhängigen Zelllinien und damit auch drei unabhängigen Transfektionsversuchen und zum anderen auch in anderen Studien gezeigt (Kowalski *et al.*, 2004; persönliche

Kommunikation mit Mitarbeitern der AG Lage am Institut für Pathologie, Charité Berlin).

4.3.2.2 Akkumulationsverhalten der Transfektanten

Die Akkumulation der Zytostatika Mitoxantron und Daunorubicin konnte mit Hilfe der Durchflußzytometrie in den abgeleiteten Transfektanten der Zelllinien 257RNOV und 257RDB ermittelt werden. Im Ergebnis der Untersuchungen zeigte sich, daß die MTMR-Transfektanten eine ähnlich hohe Akkumulation des jeweiligen Zytostatikums aufwiesen, wie die parentale nicht-resistente Zelllinie 257P. Bei den MTMR-Transfektanten der Zelllinie 257RNOV wurde teilweise sogar eine höhere Substratakkumulation nachgewiesen, als in den parental Zellen. Die resistenten Ausgangszelllinien 257RNOV bzw. 257RDB zeigten eine vergleichsweise niedrige Substratakkumulation. Die Kontrolltransfektanten beider Zelllinien konnten die Zytostatika gering, jedoch im Vergleich zur Ausgangszelllinie signifikant erhöht akkumulieren. Dieser Effekt resultiert aus einem unterschiedlichen Expressionsniveau der ABC-Proteine in Ausgangszelllinien und Kontrolltransfektanten, welches eine Folge verschiedenartiger Kultivierungsbedingungen ist. Die Ausgangszelllinien wurden unter permanentem Zytostatikumsdruck gehalten, was im Gegensatz dazu bei sämtlichen Transfektanten nicht der Fall war. Der Zytostatikumsdruck bewirkt in den Zellen eine permanente Induktion der entsprechenden ABC-Transporter, woraus ihr im Vergleich zu Kontrolllinien erhöhter Expressionslevel resultiert (Nieth and Lage, 2005). Umgekehrt wurde bereits an den beiden Ausgangszelllinien gezeigt, daß eine Kultivierung ohne Zytostatika zur Abnahme der ABC-Transporter-Expressionen bis auf ein distinktes Niveau führt, welches dann allerdings stabil erhalten bleibt (Stege *et al.*, 2004; persönliche Kommunikation mit Dipl.-Biol. A. Stege und Dipl.-Ing. A. Pribsch).

Die Ergebnisse deuten auf eine direkte Korrelation zwischen Inhibition der Ziel-mRNA und dem Akkumulationsverhalten der Zellen in den MTMR-exprimierenden Transfektanten hin. Durch die katalytische Aktivität des MTMR konnten die Ziel-mRNAs von BCRP bzw. MDR1 gespalten und damit die Translation des jeweiligen ABC-Transporters verhindert werden, woraus eine deutlich verringerte Exportkapazität der Substrate von BCRP bzw. MDR1 resultiert. Die Effekte der MTMR-Expression treten durch die Messung der Akkumulation vergleichsweise deutlicher hervor als bei der Resistenzbestimmung. Das erklärt sich daraus, daß die

DISKUSSION

ABC-Transporter MDR1 bzw. BCRP in diesen Zelllinien direkt die Zytostatika Daunorubicin bzw. Mitoxantron exportieren und somit ihre verringerte Expression im Akkumulationsverhalten meßbar ist. An der Resistenz der Zellen gegenüber dem entsprechenden Zytostatikum sind die ABC-Transporter maßgeblich beteiligt. Dennoch können in den untersuchten Zellsystemen alternative MDR-Mechanismen existieren, beispielsweise auch solche, bei denen Zytostatika im Zellinneren durch Kompartimentierung inaktiviert werden oder ihre zytotoxische Wirkung durch die Ausbildung anderer Faktoren eingeschränkt wird (s. Kap. 4.3.3).

4.3.3 ABC-Transporter-, „Restaktivität“ und alternative MDR-Mechanismen

Die Ergebnisse der quantitativen *real time* RT-PCR zeigten, daß die mRNAs der für die ABC-Transporter MDR1, BCRP und MRP2 kodierenden Gene nicht vollständig vom MTMR gespalten wurden, so daß sich eine Expression dieser Gene in allen MTMR-Transfektanten auf einem niedrigeren Niveau einstellte. Wenngleich in geringerem Maße, können die in den MTMR-Transfektanten vorhandenen ABC-Transporter die Ausbildung eines MDR-Phänotypes verursachen. Mit Hilfe von IC₅₀-Werten wurden die Resistenzfaktoren aller Zelllinien gegenüber den zu untersuchenden Zytostatika ermittelt und damit der Grad der Multidrug-Resistenz in den Transfektanten *versus* Ausgangszelllinien bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Multidrug-Resistenz aller untersuchter MTMR-Transfektanten im Vergleich zur jeweiligen Ausgangszelllinie um mindestens 50 % vermindert, allerdings nur in Einzelfällen komplett aufgehoben wurde, was auf die „Restaktivität“ der gering exprimierten ABC-Transporter in diesen Transfektanten zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus sind in den drei verwendeten MDR-Zelllinien im Vergleich zu ihren parentalen, chemosensiblen Partnern alternative Mechanismen ausgeprägt, die die spezifische MDR mitverursachen und natürlich nicht mit Hilfe des ABC-Transporter-MTMRs ausgeschaltet wurden.

In der resistenten Magenkarzinomzelllinie 257RNOV wurde beispielsweise eine erhöhte Expression der mRNA für das Heparansulfat-Proteoglycan-3 (*GPC-3*) im Zusammenhang mit der Mitoxantronresistenz der Zellen gefunden. Eine spezifische Inhibition dieser mRNA mit Hilfe eines *Hammerhead*-Ribozymes konnte die Mitoxantronresistenz der Zellen erniedrigen, allerdings nicht aufheben (Wichert *et al.*, 2004). In den MTMR-exprimierenden Transfektanten der Zelllinie 257RNOV ist

DISKUSSION

dieser Mechanismus nicht aufgehoben und ist eventuell für die noch meßbare Mitoxantronresistenz in den MTMR-exprimierenden Transfektanten verantwortlich.

Die gleiche resistente Zelllinie exprimiert auch verstärkt zwei weitere Proteine der ABC-Transporter-Superfamilie, TAP1 und TAP2 (Lage *et al.*, 2001), die als Heterodimer an der Antigenpräsentation der Zelle beteiligt und darüber hinaus in verschiedenen MDR-Zelllinien im direkten Zusammenhang mit Mitoxantronresistenz beschrieben worden ist (Neefjes *et al.*, 1993; Izquierdo *et al.*, 1996; Moriyama *et al.*, 2003). Die Überexpression des TAP1/2-Heterodimeres kann, wie GPC-3, für einen MDR-Phänotyp in den 257RNOV/MTMR-Transfektanten verantwortlich sein, obwohl das BCRP-Protein weitestgehend inhibiert ist.

Ein weiterer Chemoresistenzmechanismus, der besonders in der Zelllinie 257RNOV, aber auch in den 257RDB-Zellen ausgeprägt ist, ist die Verringerung des nukleären Gehaltes an DNA-Topoisomerasen II. Diese Enzyme sind in der Lage, durch gezielte Spalt- und Ligationsreaktionen über einen sogenannten "spaltbaren Komplex" die DNA-Doppelhelix in ihrer Topologie zu verändern und damit zu deren Entwindung beizutragen (Osheroff *et al.*, 1994). Inhibitoren des Enzymes stabilisieren den "spaltbaren Komplex", so daß der Reaktionsverlauf gestört wird. Es wird angenommen, daß der zytotoxische Effekt von Topoisomerase II-Hemmstoffen auf dieser Stabilisierung beruht (Nelson *et al.*, 1984). Umgekehrt können Resistenzen gegen Topoisomerase II-Inhibitoren von allen Prozessen herrühren, die zu einer veränderten Bindungsaffinität des Enzymes zu Therapeutika oder DNA und damit zu einer verringerten Ausbildung des "spaltbaren Komplexes" führen (Harker *et al.*, 1999; Lage and Dietel, 2002). In humanen Zellen existieren zwei Isoformen der Topoisomerase II, Topo II α und Topo II β , die homodimerisieren (Jenkins *et al.*, 1992). Im Vergleich zur parentalen Zelllinie 257P konnten in der Zelllinie 257RNOV erniedrigte Expressionswerte für beide Isoformen der Topoisomerase II und in der Zelllinie 257RDB für die Isoform Topo II β ermittelt werden (Lage *et al.*, 2006, *in press*). Die Zytostatika Daunorubicin und Mitoxantron interkalieren in der DNA und greifen somit auch die Topoisomerase II an. Eine verminderte Expression von Topoisomerasen II stellt einen zellulären Schutzmechanismus dar, um die zytotoxische Wirkung der genannten Substanzen zu verringern, woraus eine ABC-Transporter-unabhängige Resistenz in den beschriebenen Zelllinien resultiert.

DISKUSSION

Ein weiterer zellulärer Mechanismus, der zur Überwindung der zytotoxischen Wirkung von Zytostatika führt, ist die Störung von Signalkaskadewegen, die zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führen. Dieses kann beispielsweise durch ein mutiertes *p53*-Gen realisiert werden (Lowe *et al.*, 1993). Die parentale Ovarialkarzinomzelllinie A2780P exprimiert Wildtyp *p53*, wohingegen ihre cisplatinresistente Variante A2780RCIS zwei funktionelle Punktmutationen im *p53*-Gen aufweist, welche zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Diese Veränderungen im *p53*-Status der resistenten Zelllinie können zu Störungen der Apoptosesignalwege führen und stellen möglicherweise einen alternativen Resistenzmechanismus gegenüber dem Apoptose-induzierenden Agens Cisplatin dar (unpublizierte Daten Dr. V. Materna).

Es ist anzunehmen, daß die genannten Zelllinien noch weitere Strategien entwickelt haben, die zur Ausbildung von Chemoresistenzen gegen die verwendeten Zytostatika führen, jedoch noch nicht experimentell detektiert oder funktionell analysiert worden sind. Beispielsweise wurden die mRNA-Expressionsprofile der Zelllinien 257RNOV, 257RDB und 257P mit Hilfe von *Microarray*-Chips in unterschiedlichen Studien untersucht (Ludwig *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2005). Dabei konnten mehr als hundert auf- bzw. herabregulierte Gene in den einzelnen resistenten Zelllinien *versus* parental Zelllinien gefunden werden. Die Funktionen dieser Gene und ihre Bedeutung für die Chemoresistenz von Zellen erfordern jedoch noch weitere Studien. Die genannten Möglichkeiten der Ausbildung von Multidrug-Resistenzen machen deutlich, daß durch die Inhibition eines Genes bzw. die Blockade eines Resistenzweges eine hundertprozentige Remission der Zellen zum parental Phänotyp kaum erfolgen kann. Umso wichtiger ist es, möglichst Mechanismen außer Kraft zu setzen, die an oberster Stelle eines kaskadeartigen Systems von Signalen stehen, die die Zelle vor zytotoxischen Substanzen schützen. Die Inhibition der genannten ABC-Transporter ist eine solche Herangehensweise und die komplette Aufhebung der Daunorubicinresistenz in einigen MTMR-Transfektanten der Zelllinie 257RDB zeigt, daß trotz möglicher alternativer Resistenzmechanismen die Inhibition von P-Glykoprotein in diesem Zellsystem die wichtigste Strategie zur Resensitivierung ist.

4.4 Ribozyme versus Antisense-Technologie und RNAi

Für die Therapie von Krebserkrankungen ist oftmals die gezielte Ausschaltung bestimmter Gene bzw. Genprodukte erforderlich, um eine Tumorzelle derart zu schädigen, daß sie abstirbt. Um dieses Ziel zu erreichen, bietet die Anwendung von RNA-Techniken Vorteile im Vergleich zu konventionellen Therapeutika. Durch die Sequenzspezifität von RNA-Techniken kann sichergestellt werden, daß nur die Expression der Zielgene inhibiert wird. Darüber hinaus sind weder Resistenzmechanismen noch starke gesundheitsgefährliche Nebenwirkungen gegen *Antisense*-Oligonukleotide, Ribozyme oder siRNAs durch klinische Studien bekannt geworden (bislang sind jedoch erst sehr wenige klinischen Studien mit siRNAs publiziert, viele Untersuchungen wurden aber 2005 begonnen) (Wong-Staal *et al.*, 1998; Usman and Blatt, 2000). Doch nicht nur in der Krebsforschung bzw. -therapie, sondern auch im Zusammenhang mit anderen molekularbiologischen Fragestellungen ist die Inhibition spezifischer Gensequenzen notwendig. Von den vielfältigen Möglichkeiten der RNA-Techniken werden nicht katalytische *Antisense*-Oligonukleotide, Ribozymtechniken oder Methoden, die auf RNA-Interferenz (RNAi) basieren, am häufigsten angewendet. Vor- und Nachteile der einzelnen Techniken sind in der Tab. 14 dargestellt (Übersicht in: Scherer and Rossi, 2003; Jarad *et al.*, 2003).

Tabelle 14: Relative Stärken und Schwächen verschiedener RNA-Technologien

Technik	Vorteile	Nachteile
AS-ODN	<ul style="list-style-type: none"> • leichte Herstellung • können modifiziert werden, um Selektivität und Effizienz zu verbessern • können gegen Introns gerichtet werden • einfache Herstellung • jahrelange Erfahrung 	<ul style="list-style-type: none"> • können <i>in vivo</i> Interferon induzieren (wenn lang und mit CpG-Inseln) • können Proteine binden (Aptamer Aktivität) • nur exogene Applikation (synthetisch) • Berichte von <i>off-target</i> Effekten • keine katalytische Aktivität
Ribozyme	<ul style="list-style-type: none"> • katalysieren Zielsequenz • Einzelbasenpolymorphismen sind unterscheidbar • Hybridisierungssequenzen können verändert werden, um Spezifität anzupassen • einfache katalytische 	<ul style="list-style-type: none"> • erfordern Spalttriplet (am besten GUC) in Zielsequenz • können Proteine binden (Aptamer Aktivität)

DISKUSSION

	Domäne <ul style="list-style-type: none"> • können Intronen oder subzelluläre Kompartimente angreifen • exogene und systemische Applikation möglich • seit den 80er Jahren bekannt 	
RNAi	<ul style="list-style-type: none"> • effizient bei geringen Konzentrationen • exogene (siRNA) und systemische (shRNA) Applikation • Einfache Herstellung 	<ul style="list-style-type: none"> • häufig <i>off-target</i> Effekte • oft Interferon Induktion und unspezifischer mRNA-Abbau <i>in vivo</i> • nukleäre RNA oder Introns können nicht erreicht werden • systemische Anwendung erfordert spezielle Promotoren und Vektorsysteme • erst seit etwa 5 Jahren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Applikationen

Durch Evaluierung aller in Frage kommender *Antisense*-Methoden wurde in Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit aus folgenden Gründen für eine *Hammerhead*-Ribozym-basierte Technologie entschieden:

1. Die alternativen Techniken sind nicht zu einer Spaltung der Sequenzen *in cis* geeignet und damit auch nicht zur Autokatalyse. Die Freisetzung der *in trans*-aktiven Ribozyme ist jedoch nur mit Hilfe der Selbstspaltung des MTMR möglich. Durch diese ribozym-spezifischen Katalyseeigenschaften erhält das entwickelte MTMR das Potential, mehrere Zielsequenzen zu katalysieren, was durch keine der alternativen Techniken erreicht werden kann.
2. Durch die Befähigung zur Ziel-RNA-Spaltung können die katalytischen Eigenschaften von Ribozymen *a priori* im zellfreien System charakterisiert und daraus Vorhersagen für die Anwendbarkeit des jeweiligen Konstruktes im zellulären Kontext gemacht werden. Alternative Techniken können nur in Zellkulturen getestet werden, was zeit- und kostenintensiver ist, da evt. unwirksame *Antisense*-Moleküle nicht im Vorfeld ausgeschlossen werden können.
3. Im Vergleich zur RNAi sind ribozymatische Methoden bereits langjährig *in vitro* und *in vivo* angewandt worden, so daß eine Vielfalt an publizierten Daten und Erfahrungswerten verfügbar sind.
4. Der Einsatz von AS-ODN bzw. siRNAs ist insofern ineffektiv, als das diese nur

exogen appliziert werden können und Langzeiteffekte in Zellkulturen nicht meßbar sind.

5. Im Gegensatz zu Ribozymtechniken wurden sowohl bei AS-ODN als auch bei RNAi-Anwendungen sogenannte "*off-target*" Effekte sowie die Induktion von Interferonen beschrieben.
6. Unter den verschiedenen Ribozymklassen sind die *Hammerhead*-Ribozyme am besten charakterisiert. Darüber hinaus sind sie durch ihre einfache Struktur und kurze Sequenz auch vergleichsweise einfach und kostengünstig, beispielsweise als Multiribozymkonstrukt, zu synthetisieren.

In zwei Studien, die die Inhibition der *MDR1*-mRNA in den klassisch multidrug-resistenten 257RDB-Zellen mit Hilfe von siRNAs und shRNAs beschreiben, hat sich herausgestellt, daß die funktionellen Effekte der MDR1-Modulation auf einem ähnlichen Niveau waren, wie sie durch die MTMR-Expression erzielt werden konnten (Nieth *et al.*, 2002; Stege *et al.*, 2004). Im direkten Vergleich hat sich die neuere RNAi-Technologie demzufolge nicht als vorteilhafter herausgestellt.

4.5 Ausblick

Bei der Betrachtung der Chemoresistenz handelt es sich bei den meisten Tumoren, aber auch in den hier untersuchten Zellkulturmodellen, um ein Multikomponentensystem, welches von unterschiedlichen Parametern beeinflusst wird. Die Resistenz einer jeweiligen Zelle ist daher immer ein Resultat additiver Effekte verschiedener Mechanismen. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß die ABC-Transporter BCRP, MRP2 und MDR1 Hauptverursacher der jeweiligen Resistenzphänotypen in den gewählten Zellmodellen sind und deren spezifische Inhibition eine vergleichsweise dramatische Wirkung auf die chemoresistente Zelle haben. Nichtsdestotrotz könnte durch die spezifische Inhibition weiterer bekannter Resistenzfaktoren die Chemoresistenz aller dreier Zelllinien vermutlich in allen Transfektantenlinien komplett aufgehoben werden. Ein entsprechendes Multitargetmultiribozym gegen unterschiedliche Resistenzfaktoren, die in einem Zellsystem erhöht exprimiert werden, hätte das Potential der Inhibition verschiedener Gene in einem System, woraus sich möglicherweise synergistische Effekte in Bezug auf die Resensitivierung der Zellen ergeben.

Hinsichtlich seiner Praxisrelevanz stellt das hier entwickelte MTMR allerdings ein "universelles Medikament" dar. Zum einen sind die drei ABC-Transporter in vielen

DISKUSSION

Tumorentitäten resistenzassoziiert gefunden worden, zum anderen ist es vorstellbar, daß die ABC-Proteine in einem heterogenen Tumor parallel ausgebildet werden, und damit beispielsweise der Behandlung mit einer Vielzahl an Therapeutika entgegenwirken. Das ABC-Transporter-MTMR könnte hierbei im Vorfeld Chemoresistenzen verhindern und damit die Heilungschancen erhöhen.

In der Zellkultur konnte ein solcher Synergismus noch nicht überprüft werden, da die gleichzeitige Expression der ABC-Transporter MDR1/P-Gp, BCRP und MRP2 in Tumorzellen zum Beginn der Arbeit noch nicht beschrieben worden war. In einer umfangreichen Arbeit haben Szakács *et al.* (2004) die Expression aller 48 humanen ABC-Transporter-Gene in 60 verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Durch die Auswertung dieser publizierten Daten konnte eine Zelllinie identifiziert werden, die alle drei ABC-Transporter auf sehr geringem Niveau exprimiert. Es handelt sich hierbei um die Lungenkarzinomzelllinie NCI-H460. In dieser Zelllinie könnte durch den Einsatz des konstruierten MTMRs die simultane Inhibition der drei ABC-Transporter-mRNAs im zellulären Kontext gezeigt werden. Dieser Versuchsansatz ist eine wichtige neue Zielstellung für die Weiterentwicklung des MTMRs (derzeitige Arbeit d. Verf.). Darüber hinaus wird der Einsatz von siRNAs in zahlreichen Studien propagiert und teilweise den *Hammerhead*-Ribozymen vorgezogen. Obwohl in eigenen Untersuchungen der direkte Vergleich beider Techniken keinen Vorteil der RNAi-basierten Methodik erbrachte, ist diese Fragestellung noch nicht abschließend geklärt. Besonders die Eigenschaft der Multitargetspaltung offeriert ein großes Anwendungsspektrum und viele Vorteile im Vergleich zu anderen RNA-Strategien. Durch Kombination von Ribozym- und siRNA-Technik wäre jedoch die Entwicklung eines sogenannten "Multitarget-siRNA-Konstrukts" denkbar. Hierbei würden spezifische *Hammerhead*-Ribozyme durch Spaltung *in cis* jeweils *sense*- und *antisense*-Stränge von siRNA-Molekülen freisetzen, die daraufhin hybridisieren und ihre Ziel-RNA inhibieren könnten. Solch ein Konstrukt wurde jüngst am Institut für Pathologie entwickelt. Erste Ergebnisse der *in vitro*-Transkription des Multitarget-siRNA-Konstruktes deuten auf eine erfolgreiche Autokatalyse und auf eine damit verbundene Freisetzung der einzelnen siRNA-Stränge hin. Allerdings ist noch vollkommen unklar, ob die *sense*- und *antisense*-siRNA-Stränge tatsächlich hybridisieren und die gebildeten Moleküle auch inhibitorische Wirkung im zellulären Kontext entfalten (derzeitige Arbeiten d. Verf.).

5 Literaturverzeichnis

Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., Schinkel, A.H. (1999). The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* **59** (17), 4237-4241.

Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **58** (23), 5337-5339.

Amarzguioui, M., Brede, G., Babaie, E., Grotli, M., Sproat, B., and Prydz, H. (2000). Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucl. Acids Res.* **28** (21), 4113-4124.

Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 361-398.

Augustine, L.M., Markelewicz, R.J., Boekelheide, K., Cherrington, N.J. (2005). Xenobiotic and endobiotic transporters mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab. Dispos.* **33** (1), 182-189.

Bassi, G.S., Murchie, A.I.H., Lilley, D.M.J. (1996). The ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: Core sequence changes that perturb folding into the active conformation. *RNA* **2** (8), 756-768.

Bassi, G.S., Murchie, A.I.H., Walter, F., Clegg, R.M., Lilley, D.M.J. (1997). Ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: A fluorescence resonance energy transfer study. *EMBO J.* **16** (24), 7481-7489.

Bellon, S.F., Coleman, J.H., and Lippard, S.J. (1991). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* **30** (32), 8026-8035.

Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonelle, C., Lee, N.S., Good, P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D., Rossi, J.J. (1997). The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* **3** (1), 75-88.

Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92** (16), 1295-1302.

Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Wielinga, P., van Tellingen, O., Schinkel, A.H., Schellens, J.H. (2005). The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-gp inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* **65** (7), 2577-2582.

- Buzayan, J.M., Gerlach, W.L., and Bruening, G. (1986). Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* **323**, 349-353.
- Cech, T.R., Zaug, A. J., and Grabowski, P.J. (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena thermophilus*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27** (3), 487-496.
- Chaney, S.G. and Vaisman, A. (1999). Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J. Inorg. Biochem.* **77**, 71-81.
- Chen, C.-J., Banerjee, A.C., Harmison, G.G., Haglund, K., Schubert, M. (1992). Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication - potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucl. Acids Res.* **20** (17), 4581-4589.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47** (3), 381-389.
- Childs, S., Yeh, R.L., Hui, D., Ling, V. (1998). Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister of P-glycoprotein. *Cancer Res.* **58** (18), 4160-4167.
- Chin, K.V., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1993). Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv. Cancer Res.* **60**, 157-180.
- Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I. and Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **55** (5), 929-937.
- Dahm, S.C., Uhlenbeck, O.C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* **30** (39), 9464-9469.
- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42** (7), 1007-1017.
- Dean, N.M. and Bennett, C.F. (2003). Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* **22** (56), 9087-9096.
- Dias, N. and Stein, C.A. (2002). Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer. Ther.* **1** (5), 347-355.
- Dietel, M., Arps, H., Lage, H., Niendorf, A. (1990). Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* **50** (18), 6100-6106.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ding, Y. and Lawrence, C. E. (2001). Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucl. Acids Res.* **29** (5), 1034-1046.
- Ding, Y. and Lawrence, C. E. (2003). A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucl. Acids Res.* **31** (24), 7280-7301.
- Ding, Y., Chan, C. Y., and Lawrence, C. E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **32** Web Server issue, W135-W141.
- Doudna, J.A. and Cech, T.R. (2002). The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418** (6894), 222-228.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (26), 5665-5670.
- Dubin, I.N. and Johnson, F.B. (1954). Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells, a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine* **33** (3), 155-197.
- Earnshaw, D.J. and Gait, M.J. (1998). Hairpin ribozyme cleavage catalyzed by aminoglycoside antibiotics and the polyamine spermine in the absence of metal ions. *Nucl. Acid Res.* **26** (24), 5551-5561.
- Eastman, A. (1987). Glutathione-mediated activation of anticancer platinum (IV) complexes. *Pharmacol. Ther.* **36** (23), 4177-4178.
- Ee, P.L.R., He, X., Ross, D.D., Beck, W.T. (2004). Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol. Cancer Ther.* **3** (12), 1577-1583.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411** (6836), 494-498.
- Eva, A., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Srinivasan, A., Tronick, S.R., Reddy, E.P., Ellmore, N.W., Galen, A.T., Lautenberger, J.T., Papas, T.S., Westin, E.H., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Aaronson, S.T. (1982). Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature* **295** (5845), 116-119.
- Fedor, M.J., Uhlenbeck, O.C. (1992). Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes. *Biochemistry* **31** (48), 13040-13045.
- Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** (6669), 806-811.

LITERATURVERZEICHNIS

Forster, A.C. and Symons, R.H. (1987). Self-cleavage of virosoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50** (1), 9-16.

Fricker, S.P. and Buckley, R.G. (1996). Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* **16** (6B), 3755-3760.

Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* **57** (7), 727-741.

Giles, R.V. (2000). Antisense oligonucleotide technology: from EST to therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2** (3), 238-252.

Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G.M. (1989). Expression of the multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **81** (2), 116-124.

Goodchild, J. and Kohli, V. (1991). Ribozymes that cleave an RNA sequence from human immunodeficiency virus: the effect of flanking sequence on rate. *Arch. Biochem. Biophys.* **284** (2), 386-391.

Goodchild, J. (2000). Hammerhead ribozymes: Biochemical and chemical considerations. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2** (3), 272-281.

Goodchild, J. (2004). Oligonucleotide therapeutics: 25 years agrowing. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **6** (2), 120-128.

Gottesman, M.M. and Ambudkar, S.V. (2001). Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33** (6), 453-458.

Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615-627.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35** (3 Pt 2), 849-857.

Haber, D.A., Beverley, S.M., Kiely, M.L., Schimke, R.T. (1981). Properties of an altered dihydrofolate reductase encoded by amplified genes in cultured mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **256** (18), 9501-9510.

Haseloff, J and Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334** (6183), 585-591.

Heidenreich, O. and Eckstein, F. (1992). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **267** (3), 1904-1909.

LITERATURVERZEICHNIS

- Heidenreich, O., Benseler, F., Fahrenholz, A., and Eckstein, F. (1994). High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* **269** (3), 2131-2138.
- Heim, S. and Lage, H. (2005). Transcriptome analysis of different multidrug-resistant gastric carcinoma cells. *In Vivo* **19** (3), 583-590.
- Hendry, P., McCall, M.J. (1995). A comparison of the in vitro activity of DNA-armed and all-RNA hammerhead ribozymes. *Nucl. Acids Res.* **23** (19), 3928-3936.
- Hertel, K.J., Pardi, A., Uhlenbeck, O.C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W.L., Hodgson, R., Symons, R.H. (1992). Numbering system for the hammerhead. *Nucl. Acids Res.* **20** (12), 3252.
- Hertel, K.J., Herschlag, D., Uhlenbeck, O.C. (1994). A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **33** (11), 3374-3385.
- Holm, P.S., Scanlon, K.J., and Dietel, M. (1994). Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br. J. Cancer* **70** (2), 239-243.
- Holm, P.S., Dietel, M., and Krupp, G. (1995). Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and an *mdr1* mRNA segment by a hammerhead ribozyme. *Gene* **167** (1-2), 221-225.
- Hormes, R., Homann, M., Oelze, I., Marschall, P., Tabler, M., Eckstein, F., and Sczakiel, G. (1997). The subcellular localization and length of hammerhead ribozymes determine efficacy in human cells. *Nucl. Acids Res.* **25** (4), 769-775.
- Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C., Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucl. Acids Res.* **14** (9), 3627-3640.
- Izquierdo, M.A., Neefjes, J.J., Mathari, A.E., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J. (1996). Overexpression of the ABC transporter TAP in multidrug-resistant human cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **74** (12), 1961-1967.
- Jain, R.K. (2001). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (1-3), 149-168.
- James, H.A. and Gibson, I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* **91** (2), 371-382.
- Jarad, G., Simske, J.S., Sedor, J.R., and Schelling, J.R. (2003). Nucleic acid-based techniques for a post-transcriptional regulation of molecular targets. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12** (4), 415-421.
- Jenkins, J.R., Ayton, P., Jones, T., Davies, S.L., Simmons, D.L., Harris, A.L., Sheer, D., Hickson, H. (1992). Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of

human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res.* **20** (21), 5587-5592.

Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C., Schinkel, A.H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* **11** (2), 127-129.

Juliano, R.L. and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455** (1), 152-162.

Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* **97** (5), 626-630.

Kato, Y., Kuwabara, T., Warashina, M., Toda, H., and Taira, K. (2001). Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276** (18), 15378-15385.

Kawabe, T., Chen, Z.-S., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S., and Kuwano, M. (1999). Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Letters* **456** (2), 327-331.

Kelland, L.R. (2000). Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* **59** (Suppl 4), 1-8.

Kellner, U., Hutchinson, L., Seidel, A., Lage, H., Danks, M.K., Dietel, M., Kaufmann, S.H. (1997). Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma cell line in the absence of P-Glycoprotein. *Int. J. Cancer* **71** (5), 817-824.

Knutsen, T., Rao, V.K., Ried, T., Mickley, L., Schneider, E., Miyake, K., Ghadimi, B.M., Padilla-Nash, H., Pack, S., Greenberger, L., Cowan, K., Dean, M., Fojo, T., Bates, S. (2000). Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **27** (1), 110-116.

Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J.F., and Ohnuma, T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res.* **54** (5), 1271-1275.

Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., Akiyama, S., Ono, M., and Kuwano, M. (1997). A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) *Antisense* cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* **57** (24), 5475-5479.

Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and

LITERATURVERZEICHNIS

MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **57** (16), 3537-3547.

Kowalski, P., Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001). Selection and characterization of a high activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* **8** (3), 185-192.

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., and Lage, H. (2002). Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* **9** (7), 579-586.

Kowalski, P., Farley, K.M., Lage, H., and Schneider, E. (2004). Effective knock down of very high ABCG2 expression by a hammerhead ribozyme. *Anticancer Res.* **24** (4), 2231-2236.

Kowalski, P., Surowiak, P., and Lage, H. (2005). Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol. Ther.* **11** (4), 508-522.

Kruh, G.D. and Belinsky, M.G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* **22** (47), 7537-7552.

Kurreck, J. (2003). Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270** (8), 1628-1644.

Lage, H. (1999). Atypische Multidrug-Resistenz. *Arzneimitteltherapie* **17**, 39-44.

Lage, H., Jordan, A., Scholz, R., Dietel, M. (2000). Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia* **16** (4), 291-303.

Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampé, R., Dietel, M., Schadendorf, D., Sinha, P. (2001). Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Lett.* **503** (2-3), 179-184.

Lage, H and Dietel, M. (2002). Multiple Mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128** (7), 349-357.

Lage, H., Aki-Sener, E., and Yalcin, I. (2006). High antineoplastic activity of new heterocyclic compounds in cancer cells with resistance against classical DNA topoisomerase II-targeting drugs. *Int. J. Cancer, in press.*

Lee, C.H. (2004). Reversing agents for ATP-binding cassette (ABC) transporters: application in modulating multidrug resistance (MDR). *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **4** (1), 43-52.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lee, N.S., Bertrand, E., Rosel, J.J. (1997). Enhancement of ribozyme function by RNA binding proteins. *Ribozyme Protocols*, Methods in Molecular Biology **74**, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Lee, S., Schmitt, C.A. (2003). Chemotherapy response and resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13** (1), 90-96.
- Lepper, E.R., Nooter, K., Verweij, J., Acharya, M.R., Figg, W.D., Sparreboom, A. (2005). Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics* **6** (2), 115-138.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D.D., Miyake, K., Resau, J.H., Bates, S.E. (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* **113** (Pt 11), 2011-2021.
- Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K.M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P.R., Horn, T., Skovsgaard, T., Bates, S.E. (2002). Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim. Biophys. Acta* **1565** (1), 6-16.
- Liu, C., Qureshi, I.A., Ding, X., Shan, Y., Huang, Y., Xie, Y., and Ji, M. (1996). Modulation of multidrug resistance gene (mdr-1) with antisense oligodeoxynucleotides. *Clin. Sci. (Lond.)* **91** (1), 93-98.
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C. (2001). Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* **15** (3), 719-730.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74** (6), 957-967.
- Ludwig, A., Dietel, M., Lage, H. (2002). Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells. *Anticancer Res.* **22** (6A), 3213-3221.
- Materna, V., Holm, P.S., Dietel, M., and Lage, H. (2001). Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC-transporter cMOAT/MRP2/ABCC3. *Cancer Gene Ther.* **8** (3), 176-184.
- Materna, V., Liedert, B., Thomale, J., Lage, H. (2005). Protection of platinum-DNA-adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int. J. Cancer* **115** (3), 393-402.
- Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., Turner, D.H. (2004). Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (19), 7287-7292.
- McManus, M.T. and Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev.* **3** (10), 737-747.

- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56** (2), 185-229.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **59** (1), 8-13.
- Moriyama, M., Hoshida, Y., Otsuka, M., Nishimura, S., Kato, N., Goto, T., Taniguchi, H., Shiratori, Y., Seki, N., Omata, M. (2003). Relevance network between chemosensitivity and transcriptome in human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2** (2), 199-205.
- Moscow, J.A. and Cowan, K.H. (1988). Multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **80** (1), 14-20.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65** (1-2), 55-63.
- Murray, J.B., Seyhan, A.A., Walter, N.G., Burke, J.M., and Scott, W.G. (1998). The hammerhead, hairpin and VS ribozyme are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.* **5** (10), 587-595.
- Nedbal, W. and Sczakiel, G. (1997). Hammerhead ribozyme activity in the presence of low molecular weight cellular extract. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7** (6), 585-589.
- Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261** (5122), 769-771.
- Nelson, E.M., Tewey, K.M., Liu, L.F. (1984). Mechanisms of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinyl-amino)-methanesulfon-m-aniside. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (5), 1361-1365.
- Neumann, H.G. (1992). Chemotherapie von Tumoren. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. (6. Auflage), Wissenschaftsverlag, D.
- Nieth, C., Pribsch, A., Stege, A., and Lage, H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* **545** (2-3), 144-150.
- Nieth, C. and Lage, H. (2005). Induction of the ABC-transporters Mdr1/P-gp (Abcb1), mrp1 (Abcc1), and bcrp (Abcg2) during establishment of multidrug resistance following exposure to mitoxantrone. *J. Chemother.* **17** (2), 215-223.

LITERATURVERZEICHNIS

- Osada, H., Tokunaga, T., Abe, Y., Asai, S., Miyachi, H., Hatanaka, H., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Shima, K., Ueyama, Y., Osamura, Y., Nakamura, M. (2003). Reversal of drug resistance mediated by a hammerhead ribozyme against multidrug resistance-associated protein 1 in a human glioma cell line. *Int. J. Oncol.* **22** (4), 823-827.
- Osheroff, N., Corbett, A.H., Robinson, M. (1994). Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs. *Adv. Pharmacol.* **29B**, 105-126.
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., Sarkadi, B. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285** (1), 111-117.
- Ozvegy, C., Varadi, A., Sarkadi, B. (2002). Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* **277** (50), 47980-47990.
- Paolella, G., Sproat, B.S., Lamond, A.I. (1992). Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity. *EMBO J.* **11** (5), 1913-1919.
- Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, A.K., Hamilton, T.C. (1993). A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Europ. J. Cancer* **29A** (3), 395-399.
- Perriman, R., Delves, A.G., Gerlach, W.L. (1992). Extended target-side specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene* **113** (2), 157-163.
- Pinto A. L., Lippard, S. J. (1985). Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II)(cisplatin) to DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **780** (3), 167-180.
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T.D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E.B., Izumi, Y., Campbell, R.B., Berk, D.A., Jain, R.K. (2001). Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (8), 4628-4633.
- Prestayko, A.W., D'Aoust, J.C., Issell, B.F., Crooke, S.T. (1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinumII). *Cancer Treat. Rev.* **6** (1), 17-39.
- Priebsch, A., Rompe, F., Kowalski, P., Surowiak, P., Stege, A., Materna, V., Lage, H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance (MDR) by RNA interference in human gastric carcinoma cells. *submitted*
- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E.L., Yang, C.-H., Litman, T., Bates, S.E., Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP,MXR,ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **271** (1), 42-46.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P., Doyle, L.A. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **91** (5), 429-433.
- Ross, D.D., Karp, J.E., Chen, T.T., Doyle, L.A. (2000). Expression of breast cancer resistance in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **96** (1), 365-368.
- Rossi, J.J. (1992). Ribozymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3** (1), 3-7.
- Sargent, J.M., Williamson, C.J., Maliepaard, M., Elgie, A.W., Scheper, R.J., Taylor, C.G. (2001). Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **115** (2), 257-262.
- Sarkadi, B., Özvegy-Laczka, C., Német, K., Váradi, A. (2004). ABCG2 - a transporter for all seasons. *FEBS Letters* **567** (1), 116-120.
- Schellens, J.H., Malingre, M.M., Kruijtz, C.M., Bardelmeijer, H.A., van Tellingen, O., Schinkel, A.H., Beijnen, J.H. (2000). Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *Eur. J. Pharm. Sci.* **12** (2), 103-110.
- Scherer, L.J. and Rossi, J.J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology* **21** (12), 1457-1465.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to an increased sensitivity to drugs. *Cell* **77** (4), 491-502.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P. (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (8), 4028-4033.
- Shahi, S., and Banerjee, A.C. (2002). Multitarget ribozyme against the S1 genome segment of reovirus possesses novel cleavage activities and is more efficacious than its constituent mono-ribozymes. *Antiviral Res.* **55** (1), 129-140.
- Shimayama, T., Nishikawa, S., Taira, K. (1995). Generality of the NUX rule: Kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry* **34** (11), 3649-3654.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22** (47), 7265-7279.
- Sigurdsson, S.T., Eckstein, F. (1995). Structure-function relationship of hammerhead ribozymes: from understanding to applications. *Trends Biotechnol.* **13** (8), 286-289.

LITERATURVERZEICHNIS

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mc Mahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82** (13), 1107-1112.

Sparreboom, A., Danesi, R., Ando, Y., Chan, J., Figg, W.D. (2003). Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* **6** (2), 71-84.

Stage-Zimmermann, T.K. and Uhlenbeck, O.C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* **4** (8), 875-889.

Staud, F., Pavek, P. (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. and Cell. Biol.* **37** (4), 720-725.

Stege, A., Priebisch, A., Nieth, C., and Lage, H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* **11** (11), 699-706.

Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Sauerbrey, A. (2002). BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* **16** (8), 1443-1447.

Steinbach, D., Lengemann, J., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F., Sauerbrey, A. (2003). Response to Chemotherapy and Expression of the Genes Encoding the Multidrug Resistance-associated Proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **9** (3), 1083-1086.

Stephenson, M.L and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1), 285-288.

Stuart, D.D., Kao, G.Y., and Allen, T.M. (2000). A novel, long-circulating , and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther.* **7** (3), 466-475.

Sun, L.Q., Cairns, M.J., Saravolac, E.G., Baker, A., and Gerlach, W.L. (2000). Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol. Rev.* **52** (3), 325-347.

Surowiak, P., Materna, V., Denkert, C., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dietel, M., Zabel, M., Lage, H. (2005). Significance of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein coexpression in ovarian cancers. *Cancer Lett., epub*

Szakács, G., Annereau, J.-P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K.J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G.D., Reimers, M., Weinstein, J.N., and Gottesman, M.M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* **6** (2), 129-137.

Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S., and Furukawa, K. (1991). Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of

run-off and (G)-free transcription and in vivo as multi-sequences transcription vectors. *Nucleic Acids Res.* **19** (19), 5125-5130.

Taira, K., Oda, M., Shinshi, H., Maeda, H., and Furukawa, K. (1990). Construction of a novel artificial-ribozyme-releasing plasmid. *Protein Engineering* **3** (8), 733-737.

Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S., Kuwano, M. (1996). A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* **56** (18), 4124-4129.

Tidefelt, U., Liliemark, J., Gruber, A., Liliemark, E., Sundman-Engberg, B., Juliusson, G., Stenke, L., Elmhorn-Rosenborg, A., Mollgard, L., Lehman, S., Xu, D., Covelli, A., Gustavsson, B., Paul, C. (2000). P-Glycoprotein inhibitor valspodar (PSC 833) increases the intracellular concentrations of daunorubicin in vivo in patients with P-glycoprotein-positive acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18** (9), 1837-1844.

Tönnies, H., Poland, J., Sinha, P., Lage, H. (2003). Association of genomic imbalances with drug resistance and thermoresistance in human gastric carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **103** (6), 752-758.

Tuschl, T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **20** (5), 446-448.

Uhlenbeck, O.C. (2003). Less isn't always more. *RNA* **9** (12), 1415-1417.

Usman, N. and Blatt, L.M. (2000). Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J. Clin. Invest.* **106** (10), 1197-1202.

van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* **27** (1), 123-130.

Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* **110**, 39-48.

Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., Kuwano, M. 1998 Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7** (2), 203-207.

Wani, M.A., Xu, X., Stambrook, P.J. (1994). Increased methotrexate resistance and dhfr amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells. *Cancer Res.* **54** (9), 2504-2508.

Weiss, R.B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* **19** (6), 670-686.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., Lage, H. (1999). Selection of a high activity ribozyme against cytostatic drug resistance-associated glypican-3 using *in vitro* assay containing total tumor RNA. *Cancer Gene Ther.* **6** (3), 263-270.
- Wichert, A., Stege, A., Midorikawa, Y., Holm, P. S., Lage, H. (2004). Glypican-3 is involved in cellular protection against mitoxantrone in gastric carcinoma cells. *Oncogene* **23** (4), 945-955.
- Wong-Staal, F., Poeschla, E.M., and Looney, D.J. (1998). A controlled, phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum. Gene Ther.* **9** (16), 2407-2425.
- Wu, H., Hait, W.N., and Yang, J.M. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1. *Cancer Res.* **63** (7), 1515-1519.
- Xu, D., Kang, H., Fisher, M., Juliano, R.L. (2004). Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. *Mol. Pharmacol.* **66** (2), 268-275.
- Xu, D., McCarty, D., Fernandes, A., Fisher, M., Samulski, R.J., and Juliano, R.L. (2005). Delivery of MDR1 Small Interfering RNA by Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus Vector. *Mol. Ther.* **11** (4), 523-530.
- Yagüe, E., Higgins, C.F., and Raguz, S. (2004). Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* **11** (14), 1170-1174.
- Yasui, K., Mihara, S., Zhao, C., Okamoto, H., Saito-Ohara, F., Tomida, A., Funato, T., Yokomizo, A., Naito, S., Imoto, I., Tsuruo, T., and Inazawa, J. (2004). Alterations in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res.* **64** (4), 1403-1410.
- Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1), 280-284.
- Zeller und zur Hausen. (1995). Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. *Loseblattsammlung*.
- Zoumadakis, M, Tabler, M. (1995). Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucl Acids Res* **23** (7), 1192-1196.
- Zuker, M. and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9** (1), 133-148.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244** (4900), 48-52.

6 Abkürzungen und Kurzdefinitionen

A	Radioaktivität
A _{kal}	Radioaktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung
A _{Mess}	gemessene Radioaktivität
ABC	<i>Adenosintriphosphat binding cassette</i>
ABCA-G	ABC-Protein der Kategorien A-G
AK	Antikörper
ALD	<i>Aldolase</i> -kodierendes Gen
Antigen	gegen die Expression eines Gens gerichtet
antisense	Komplementärstrang einer Nukleinsäure
A2780P	parentale, sensitive Ovarialkarzinomzelllinie A2780P
A2780RCIS	atypisch multidrug-resistente Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS
A2780RCIS/ Kontrolle	abgeleitete Transfektante der Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS, die den unmodifizierten Vektor pIRES2/EGFP exprimiert
A2780RCIS/ MTMR	abgeleitete Transfektante der Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS, die den MTMR Expressionsvektor pIRES2/MTMR exprimiert
AS-ODN	<i>Antisense</i> -Oligodesnukleotide
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
blunt-end	mit geraden Enden
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure; <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CisPt	Cisplatin
cMOAT	kanalförmiger multispezifischer Anionentransporter; <i>canalicular multispecific organic anion transporter</i>
CMV	Cytomegalievirus
CpG	CG-reiche Regionen der DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute; <i>counts per minute</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure; <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNR	Daunorubicin
ds	Doppelstrang; <i>double stranded</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
env-RNA	RNA, die für die Hüllproteine des HI-Virus kodiert; <i>envelope</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
ΔG	freie Energie
G2-Phase	Interphase 2 des Zellzyklus'; <i>Gap Phase</i>
G418	Genetizin-Sulfat
GAPDH	Glyzeraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GPC-3	Heparansulfat-Proteoglycan-3
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV	humaner Immunschwäche Virus; <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
IC ₅₀	halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration
<i>in cis</i>	denselben Nukleinsäurestrang betreffend
IgG	Immunglobulin G
<i>in silico</i>	computergestützt

ABKÜRZUNGEN UND KURZDEFINITIONEN

<i>in trans</i>	den gegenüberliegenden Nukleinsäurestrang betreffend
<i>in vitro</i>	im Modellsystem
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
k_{cat}	Reaktionsrate
k_M	Affinitätskonstante von Enzym und Substrat
k_{cat}/k_M	Kinetischer Parameter
k_{obs}	beobachtete Reaktionsrate; <i>observed cleavage rate</i>
LB	Luria-Bertani
ln	natürlicher Logarithmus
mAb	monoklonaler Antikörper; <i>monoclonal antibody</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase; <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	Multidrug-Resistenz oder Vielfachresistenz; <i>Multidrug resistance</i>
MDR1	Multidrug-Resistenz Protein 1; <i>Multidrug Resistance Protein 1</i>
M-Phase	Zellteilungsphase des Zellzyklus'; <i>Mitose Phase</i>
mRNA	Boten-RNA; <i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
MTR	Multitarget-Ribozyme
MTMR	Multitargetmultiribozym
<i>multiple turnover</i>	Substratüberschuß im Vergleich zum Ribozym
MX	Mitoxantron
$n_{Transkript}$	Transkriptstoffmenge
n_{UTP}	Stoffmenge des unmarkierten UTPs
N_{UMP}	Anzahl der UMPs im Transkriptmolekül
n.a.	nicht analysiert
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
<i>off-target</i>	nicht im Zusammenhang mit der Zielsequenz stehend
P_t	Stoffmenge des gebildeten Produktes zum Zeitpunkt t
p53	zelluläres Protein von 53 kDa
PCR	Polymerasekettenreaktion; Polymerase Chain Reaction
P-Gp	P-Glykoprotein
<i>pro analysi</i>	zur Analyse
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute; <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
Rz	<i>Hammerhead</i> -Ribozym
shRNA	kleine hybridisierende RNA; <i>small hybrid RNA</i>
<i>silencing</i>	Abschwächung der Transkriptionsaktivität in einem bestimmten Genomabschnitt durch benachbarte Sequenzen
<i>single turnover</i>	Ribozymüberschuß
siRNA	kleine interferierende RNA; <i>small interfering RNA</i>
SPACER	Zwischensequenz
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus'
ss	Einzelstrang; <i>single stranded</i>
SRB	Sulforhodamin B

ABKÜRZUNGEN UND KURZDEFINITIONEN

Stw	Standardabweichung
ΔS	molarer Stoffumsatz
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_a	Hybridisierungstemperatur der Primer; <i>annealing temperature</i>
t_{kal}	Zeitpunkt der Kalibrierung
T_m	Schmelztemperatur; <i>melting temperature</i>
U	Einheit der Enzymaktivität; <i>unit</i>
ü.N.	über Nacht
UMP	Uracil-5'-Monophosphat
UTP	Uracil-5'-Triphosphat
v_{ini}	Initialgeschwindigkeit
% (v/v)	Volumenprozent
W	Faktor für zufälligen Einbau unmarkierter Nukleotide in ein Molekül
257P	parentale, sensitive Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P
257RDB	klassisch multidrug-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB
257RDB/ Kontrolle	abgeleitete Transfektante der Magenkarzinomzelllinie 257RDB, die den unmodifizierten Vektor pIRES2/EGFP exprimiert
257RDB/MTM	abgeleitete Transfektante der Magenkarzinomzelllinie 257RDB, die den MTMR Expressionsvektor pIRES2/MTMR exprimiert
R	
257RNOV	atypisch multidrug-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV
257RNOV/ Kontrolle	abgeleitete Transfektante der Magenkarzinomzelllinie 257RNOV, die den unmodifizierten Vektor pIRES2/EGFP exprimiert
257RNOV/ MTMR	abgeleitete Transfektante der Magenkarzinomzelllinie 257RNOV, die den MTMR Expressionsvektor pIRES2/MTMR exprimiert
x	fache(r)
% (w/v)	Masseprozent

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei PD Dr. rer. nat. Hermann Lage für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und sorgfältige Korrektur dieser Dissertation bedanken. Die hervorragende Zusammenarbeit mit Dr. Lage und die vielen Freiräume, die mir in der Bearbeitung des Themas gegeben wurden, haben meine Kreativität beflügelt und die Freude am Forschen stets aufrecht erhalten. Darüber hinaus hat Dr. Lage den wissenschaftlichen Austausch mit anderen Forscherguppen intensiv gefördert, beispielsweise durch die Bewilligung mehrerer Kongreßreisen, auf denen die Ergebnisse in einem internationalen Rahmen präsentiert werden konnten und die durch anregende Diskussionen hochmotivierend wirkten.

Der Arbeitsgruppe Multidrug-Resistenz um PD Dr. rer. nat. H. Lage am Institut für Pathologie der Charité Berlin danke ich herzlich für die Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit. Dank der großartigen Kooperation und Hilfe aller Arbeitskollegen während meiner Schwangerschaft konnten alle anstehenden Versuche in dieser Zeit durchgeführt werden. Insbesondere Birgit Schaefer und Barbara Meyer-Bartell sind in diesem Punkt hervorzuheben. Darüber hinaus danke ich besonders Dr. rer. nat. Verena Materna, die mit ihrem Forschergeist und der Korrektur des Manuskriptes das Gelingen der Arbeit gefördert hat.

Bei meinen Eltern Sigrid und Norbert Kowalski möchte ich mich für ihre bedingungslose Unterstützung während der gesamten Dissertationsphase bedanken. Bei Herrn Dr. Dr. Ulrich Kausmann bedanke ich mich sehr herzlich für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Nicht zuletzt konnte die Arbeit durch die Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt werden. Diese hat sowohl einem Erstantrag als auch der Verlängerung des Forschungsvorhabens zugestimmt und damit die Durchführbarkeit der Dissertation initial entschieden.

Dem Verantwortlichen am Institut für Pathologie der Charité Berlin danke ich für die Bereitstellung sämtlicher Materialien und Geräte sowie der hervorragend ausgestatteten Laboratorien.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Petra Sigrid Kowalski
 geboren am 29.12.1974 in Berlin
 Kind Elena Sophie Kowalski, geboren am 06.07.04 in Berlin

Schulbildung

1981 - 1991 Polytechnische Oberschule, Berlin
 1991 - 1994 Gymnasium "Carl von Ossietzky", Berlin, Abschluß Abitur (Note 1,6)

Beruflicher Werdegang

1994 - 2000 Studium der Biologie an der Humboldt Universität zu Berlin
 Abschluß Diplom (Prädikat "sehr gut")
 Spezialisierungen in Genetik, Biochemie und Molekularbiologie
 1996 - 1997 Studentische Mitarbeit AG Zytogenetik, Humboldt Universität zu Berlin
 Thema: "Gendetektion in *Drosophila* mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung"
 1997 Forschungsaufenthalt an UNESP, Universität Botucatu, Brasilien,
 gefördert durch ein Stipendium der *International Association for the Exchange of Students for Technical Experience* (IAESTE)
 Thema: "*Structural studies on snake venom proteins using crystallographic techniques*"
 1998 – 1999 Praktikum und freie wissenschaftsjournalistische Tätigkeit beim
 Rundfunk Berlin Brandenburg (RBB) für das Umweltmagazin "Ozon",
 Veröffentlichung von verschiedenen Fernsehbeiträgen, u.a. im ARD-
 Wissenschaftsmagazin GLOBUS
 1999 - 2000 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Charité, Humboldt
 Universität zu Berlin,
 gefördert durch die Studentische Forschungsförderung der Charité Berlin
 Thema: "Mitoxantronresistenz von Magenkarzinomzellen:
 Charakterisierung eines Anti-BCRP Hammerhead Ribozymes"
 2001 Forschungsaufenthalt am Wadsworth Center, New York State
 Department of Health, Albany, NY, USA
 Thema: "Characterization of Anti-BCRP hammerhead ribozymes"
 2002 - 2006 Arbeit an der DFG-geförderten Promotionsarbeit zum Thema
 "Modulation verschiedener Multidrugresistenzen mittels eines
 Multitargetmultiribozymes"
 seit Jan 2005 Arbeit an einem DFG-Folgeprojekt zum MTMR

9 Publikationen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Kowalski, P., Wichert, A., Holm, P.S., Dietel, M., Lage, H. (2001).
Selection and characterization of a high-activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2.
Cancer Gene Therapy, 8 (3): 185-192.

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., Lage, H. (2002).
Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2.
Cancer Gene Therapy, 9 (7): 579-586

Kowalski, P., Farley, K.M., Lage, H., Schneider, E. (2004).
Effective knock down of very high ABCG2 expression by a hammerhead ribozyme.
Anticancer Research, 24 (4): 2231-2235

Kowalski, P., Surowiak, P., Lage, H. (2005).
Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP.
Molecular Therapy, 11 (4): 508-522

Priebsch, A., Rompe, F., Kowalski, P., Surowiak, P., Stege, A., Materna, V., Lage, H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance (MDR) by RNA interference in human gastric carcinoma cells. *submitted*

Kongreßbeiträge

Kowalski, P., Farley, K., Lage, H., and Schneider, E. (2002).
A hammerhead ribozyme downregulates BCRP gene expression and decreases mitoxantrone resistance in MCF7/MX breast cancer cells.
93. *AACR Annual Meeting*, San Francisco, CA, USA

Kowalski, P. and Lage H. (2003).
Simultaneous cleavage of mRNAs encoding the multidrug resistance-associated ABC transporters P-Gp, MRP2, and BCRP with a multitarget multiribozyme.
12. *AEK-Congress of the German Cancer Society*, Würzburg

Kowalski, P. and Lage, H. (2004).
Simultaneous silencing of multidrug resistance-associated ABC transporters P-gp, MRP2, and BCRP.
95. *AACR Annual Meeting*, Orlando, FL, USA

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfaßt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.

Berlin, den 25.01.06

Petra Kowalski